

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2017

Matea Kušen
825/N

**OPTIMIRANJE UVJETA
EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI
AKTIVNIH KOMPONENTA IZ
LISTA MASLINE**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof. dr.sc. Jasenke Gajdoš Kljusurić uz pomoć dr.sc. Ane Jurinjak Tušek.

ZAHVALA

Posebna zahvala mentorici izv.prof. dr.sc. Jasenki Gajdoš Kljusurić na prijateljskom pristupu, stručnoj pomoći i posvećenom vremenu. Također veliko hvala dr.sc. Ani Jurinjak Tušek na velikoj pomoći, uloženom trudu i pristupačnosti prilikom izrade ovoga rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenja, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

OPTIMIRANJE UVJETA EKSTRAKCIJE BIOLOŠKI AKTIVNIH KOMPONENTA IZ LISTA MASLINE

Matea Kušen, 825/N

Sažetak: Listovi masline (*Olea europea* L.) su potencijalni izvor biološki aktivnih spojeva, a posebice polifenolnih spojeva. U ovom radu provedene su tri različite ekstrakcije: klasična ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima te ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ultrazvukom. Provedena je analiza utjecaja temperature ekstrakcije, vremena ekstrakcije, brzine miješanja, veličine čestica, snage mikrovalova te snage ultrazvuka na učinkovitost ekstrakcija. Ekstraktima su određena fizikalna svojstva (vodljivost, TDS, pH, suha tvar) te kemijska svojstva (ukupni polifenoli i antioksidacijska aktivnost pomoću ABTS, DPPH i FRAP metode). Primjenom metode odzivne površine određeni su optimalni uvjeti za provedbu sve tri vrste ekstrakcije te je provedena analiza korelacija i analiza osnovnih komponenata na prikupljenom skupu podataka. Provedeno je optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom klasične ekstrakcije, ekstrakcije potpomognute mikrovalovima te ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom. Razvijeni su također modeli lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih karakteristika pripremljenih ekstrakata na temelju različitih procesnih uvjeta ekstrakcije. Rezultati pokazuju da se optimalni uvjeti za ekstrakciju polifenola te antioksidacijsku aktivnost razlikuju ovisno o korištenoj metode ekstrakcije. Modeli lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline pokazuju na temelju koeficijenta determinacije da razvijeni modeli nisu pouzdani za predviđanje svih analiziranih varijabli.

Ključne riječi: list masline, polifenoli, antioksidansi, ekstrakcija

Rad sadrži: 72 stranica, 15 slika, 14 tablica, 61 literaturnih navoda, 00 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof.dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić

Pomoć pri izradi: dr.sc. Ana Jurinjak Tušek, viši asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. Davor Valinger
2. Prof.dr.sc. Jasenka Gajdoš Kljusurić
3. Doc.dr.sc. Maja Benković
4. Doc.dr.sc. Danijela Bursać-Kovačević (zamjena)

Datum obrane: rujan, 2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Measurements, Regulation and Automatization

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

OPTIMIZING THE CONDITIONS OF EXTRACTS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS FROM OLIVE LEAF

Matea Kušen, 825/N

Abstract: Olive leaf (*Olea europea* L.) is a potential source of biologically active compounds, especially polyphenols. This paper observes three different extractions: classical extraction, microwave-assisted extraction and ultrasound assisted extraction. Analysis of the effect of extraction temperature, extraction time, mixing speed, particle size, microwave and ultrasound power on efficiency of the extractions was performed. Physical (conductivity, TDS, pH, dry matter) and chemical properties (total polyphenol and antioxidant activity using ABTS, DPPH and FRAP method) of the extracts have been determined. Using the response surface method, optimal conditions for the implementation of all three types of extraction were determined and correlation analysis and analysis of the basic components were performed on the collected data set. Optimization of extraction conditions of biologically active components from olive leaf by classical extraction method, microwave-assisted extraction and microwave-assisted extraction and ultrasound was performed. Models of local linear regression were also developed to predict the physical and chemical characteristics of prepared extractions based on different conditions of the extraction process. Results show that optimal conditions for extraction of polyphenols and antioxidant activity differ depending on the extraction method used. Local linear regression models for predicting physical and chemical properties of aqueous olive leaf extracts show that based on the determination coefficient, that the developed model is not reliable for predicting all analysed variables.

Keywords: olive leaf, polyphenols, antioxidants, extraction

Thesis contains: 72 pages, 15 figures, 14 tables, 61 references, 00 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD. Jasenka Gajdoš Kljusurić, Full Professor

Technical support and assistance: PhD. Ana Jurinjak Tušek, senior scientific assistant

Reviewers:

1. PhD. Davor Valinger, Assistant professor
2. PhD. Jasenka Gajdoš Kljusurić, Full professor
3. PhD. Maja Benković, Assistant professor
4. PhD. Danijela Bursać-Kovačević, Assistant professor(substitute)

Thesis defended: September, 2016

Sadržaj:

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	2
2.1. Maslina	2
2.1.1. List masline	2
2.2. Polifenoli i njihov utjecaj na zdravlje	3
2.2.1. Oksidativni stres	4
2.2.2. Antioksidativna aktivnost	5
2.2.3. Fenolni spojevi lista masline	6
2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista masline	8
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	10
2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Uzorci	12
3.1.2. Otapala i reagensi	12
3.1.3. Aparatura i pribor	13
3.2. Metode	14
3.2.1. Usitnjavanje suhih listova biljke masline	14
3.2.2. Prosijavanje pripremljenih usitnjenih listova masline	14
3.2.3. Klasična ekstrakcija biološki aktivnih komponenti	14
3.2.4. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenti potpomognuta mikrovalovima te mikrovalovima i ultrazvukom	16
3.2.5. Određivanje fizikalnih svojstava ekstrakata	17
3.2.6. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja	17
3.2.7. Određivanje udjela ukupnih polifenola	18
3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta	19
3.2.8.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom	19
3.2.8.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom	21
3.2.8.3. FRAP metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti	22
3.2.9. Statistička analiza i matematičko modeliranje	23
3.2.9.1. Metoda odzivnih površina za planiranje eksperimenata	23
3.2.9.2. Osnovna statistička analiza rezultata	24
3.2.9.3. Multivarijantna analiza varijance (MANOVA)	24
3.2.9.4. Analiza osnovnih komponenata (PCA)	25
3.2.9.5. Modeli lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije, postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima te postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom klasične ekstrakcije	27
4.1.1. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije	27

4.1.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom klasične ekstrakcije _____	35
4.1.3. Modeli lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije _____	37
4.2. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima _____	40
4.2.1. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata iz lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima _____	40
4.2.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima _____	48
4.2.3. Modeli lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata iz lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima _____	50
4.3. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom _____	53
4.3.1. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata iz lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom _____	53
4.3.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom _____	61
4.3.3. Modeli lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata iz lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom _____	63
5. ZAKLJUČCI _____	66
6. LITERATURA _____	68

1.UVOD

Maslina (*Olea europaea* L.) je vrlo važna poljoprivredna kultura u mediteranskim zemljama. Maslinovo ulje i plodovi masline su glavne komponente mediteranske prehrane te im se pripisuje blagotvoran učinak na zdravlje čovjeka. List masline također ima značajnu vrijednost te se u posljednje vrijeme sve više istražuje njegov biološki potencijal. Mnoga istraživanja su potvrdila ljekovita svojstva lista masline kao što su antimikrobni, antiupalni, antikancerogeni, hipoglikemijski te hipolipidemijski učinak.

Posljednjih godina sve je veći interes za zdravstveni učinak raznih biljnih čajeva. Čaj od maslinovog lišća je jedan od najčešćih tradicionalnih biljnih čajeva koji se od davnina koristi u mediteranskim zemljama za liječenje određenih bolesti. Pozitivni učinci lista masline povezuju se s polifenolnim komponentama koje u posljednje vrijeme sve više privlače pozornost zbog svoje izvanredne antioksidacijske aktivnosti. Polifenoli se iz lista masline izdvajaju procesom ekstrakcije. Danas postoji velik broj ekstrakcijskih metoda koje se koriste za izolaciju biološki aktivnih komponenti iz lista masline.

Budući da je potražnja za čajem lista masline iz dana u dan sve veća, u ovom radu istraživani su vođeni ekstrakti lista masline. Ispitan je utjecaj klasične ekstrakcije, ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom (UAE) na koncentraciju ukupnih polifenola. Provedena je analiza utjecaja temperature ekstrakcije, vremena ekstrakcije, brzine miješanja, veličine čestica, snage mikrovalova te snage ultrazvuka na učinkovitost ekstrakcije. Cilj ovog rada bio je odrediti fizikalna svojstva (vodljivost, TDS, pH, suha tvar) vođenih ekstrakata lista masline, optimalne uvjete za ekstrakciju ukupnih polifenola (UF) i antioksidacijsku aktivnost (AOA) DPPH metodom, FRAP metodom te ABTS metodom. Primjenom metode odzivne površine određeni su optimalni uvjeti za provedbu sve tri vrste ekstrakcije te je provedena analiza korelacija i analiza osnovnih komponenata na prikupljenom skupu podataka. Provedeno je optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom klasične ekstrakcije, ekstrakcije potpomognute mikrovalovima te ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom. Razvijeni su također modeli lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih karakteristika pripremljenih ekstrakata na temelju različitih procesnih uvjeta ekstrakcije.

2.TEORIJSKI DIO

2.1. Maslina

Maslina (*Olea europaea* L.) je zimzelena biljka, botanički pripada porodici *Oleaceae*, rod *Olea*. Biljka se sastoji od stabla koje je nepravilnog oblika visokog do 10 metara, ukoliko nije u intenzivnom uzgoju, s mnoštvom kvrga i lišća, koje je svijetlozelene i tamnozelene boje eliptičnog oblika (Yaseen Khan i sur., 2007).

Plodnost masline nastupa oko 6. ili 7. godine starosti stabla. Početna rodnost masline postupno raste do 12-te godine starosti, kada maslina prolazi svojevrsan pubertet i dolazi do pune rodности, koja traje u prosjeku do 30-te godine starosti stabla. To je razdoblje najvažnije za gospodarsku opravdanost uzgoja masline. U razdoblju od 30 do 50 godina starosti maslina postupno smanjuje rodnost. Maslina (*Olea europaea* L.) je jedna od najvažnijih usjeva u mediteranskim zemljama. Više od osam milijuna hektara maslina se uzgaja u svijetu, dok 98 % svjetskog usjeva raste u mediteranskim zemljama (Peralbo-Molina i de Castro, 2013). Ujedno, zemlje Mediterana su i najveći proizvođač maslinovog ulja. Maslina je simbol Mediterana i biljka koja je stara koliko i čovječanstvo. Svojim je blagodatima kao hrana, ulje i lijek pridonijela u mnogo čemu čovjeku i njegovu biću. *Olea europaea* L. detaljnije je proučavana zbog svoje prehrambene uporabe. Plodovi masline i ulje važni su sastojci u dnevnoj prehrani velikog dijela svijeta (Pereira i sur., 2007).

Proizvodnja masline (*Olea europea* L.) ima dugu tradiciju u Hrvatskoj. U priobalnom području Hrvatske maslina je najraširenija voćna kultura i zauzima površinu od oko 27 000 ha.

2.1.1. List masline

Listovi masline smatraju se jeftinom sirovinom koja može poslužiti kao izvor visoko vrijednih fenolnih spojeva i upravo zbog toga u posljednjih nekoliko godina dolazi do porasta interesa za istraživanjem lista masline (Salah i sur., 2012). Listovi masline dostupni su tijekom cijele godine, a najzastupljeniji su tijekom rezidbe.

Ekstrakti lista masline se na mediteranskom području primjenjuju u narodnoj medicini još od srednjeg vijeka (Gucci i sur., 1997). Smatra se da su ljekovita svojstva lista masline otkrili stari Egipćani te su ga koristili za liječenje groznice i malarije. Listovi masline koriste su u

ljudskoj prehrani u obliku ekstrakta, biljnog čaj ili prašaka, a sadrže mnoge potencijalno bioaktivne spojeve. Mnoga istraživanja su pokazala da listovi masline imaju blagotvorni učinak na metabolizam kada se koriste kao tradicionalni biljni pripravak. Ta svojstva pripisuju se fenolnim spojevima maslinovog lišća.

Kemijski sastav listova masline ovisi o nekoliko uvjeta kao što su porijeklo, udio grane na stablu, uvjeti skladištenja, klimatski uvjeti, sadržaj vlage i stupanj kontaminacije tlom i uljima (El i Karakaya, 2009). Fotografija listova masline prikaza je na slici 1.



Slika 1. Listovi masline (*Olea europaea* L.) (Anonymus, 2017)

2.2. Polifenoli i njihov utjecaj na zdravlje

Polifenoli su sveprisutni u biljkama koje se koriste u ljudskoj prehrani. Posljednjih 15-ak godina detaljno se istražuju zbog svojih antioksidativnih svojstava i potencijalno blagotvornog učinka na zdravlje (Shahidi i Ambigaipalan, 2015).

Premda se polifenoli u prehrambenoj industriji koriste kao prirodni aditivi, najvažnije područje primjene polifenolnih spojeva je svakako ono usmjereno na poboljšanje ljudskoga zdravlja. Mnogi biljni ekstrakti bogati polifenolima koriste se kao dodaci prehrani ili se mogu implementirati u različite kozmetičke ili farmaceutske proizvode (Munin i Edwards-Lévy, 2011). Biodostupnost polifenola se mijenja kako oni prolaze razne metaboličke putove u

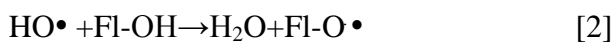
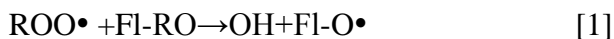
organizmu (Scalbert i Williamson, 2000) te da bi se moglo govoriti o značaju polifenola za zdravlje potrebno je znati u kojoj mjeri se oni apsorbiraju u u organizmu.

Polifenoli su velika skupina fitokemikalija koje nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka i imaju bitan učinak na normalne fiziološke procese u biljci poput rasta, pigmentacije, rezistencije na patogene, zaštite od UV zračenja i drugo. Radi se o vrlo heterogenoj skupini spojeva, a osnovno obilježje svih polifenola je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Escarpa i Gonzalez, 2001). Do danas je poznato približno 8000 polifenolnih molekula, a najznačajnije skupine su: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Bravo, 1998; Escarpa i Gonzalez, 2001; Manach i sur., 2004; Biesalski, 2007). Polifenolne tvari imaju i važnu ulogu u fiziološkim procesima ljudskog organizma. Štiteći membrane ljudskih stanica od oštećenja slobodnim radikalima, doprinose prevenciji brojnih bolesti vezanih uz oksidativni stres.

Znanstveno su dokazana mnogobrojna biološka djelovanja polifenola, kao što su antioksidativno, antiradikalsko, protuupalno, protumikrobno, imunomodulacijsko, protualergijsko, protukancerogeno, hipoglikemijsko i druga (Yoon i Baek, 2005; Biesalski, 2007). Stoga literaturni podaci sve snažnije podupiru hipotezu da bi polifenoli, uz vitamine i minerale, mogli biti korisni u sprečavanju i liječenju različitih bolesti vezanih uz oksidativni stres, kao što su primjerice maligna oboljenja, kronične upalne i alergijske reakcije, bolesti srca i krvožilnog sustava, neurodegenerativne i druge bolesti (Bohm i sur., 1998; Middleton i sur., 2000).

2.2.1. Oksidativni stres

Kisik je molekula neophodna za svako živo biće, jer je važan za proizvodnju energije u stanici. Kada se u staničnim organelima zvanim mitohondrij proizvodi energija u formi ATP (adenozil trifosfat) dolazi i do stvaranja slobodnih radikala. Slobodni radikal je svaka molekula koja sadrži nesparene elektrone. Slobodni radikali mogu donirati elektron ili primiti elektrone od drugih molekula, odnosno mogu biti oksidansi ili reducensi. Budući da u svojoj orbitali sadrže nesparene elektrone, takve molekule su vrlo reaktivne (Prior i Xu, 2013). Unatoč brojnim istraživanjima mehanizma zaštitnog djelovanja flavonoida on je i dalje predmetom mnogih rasprava. Flavonoidi (Fl) djeluju kao antioksidansi mehanizmom hvatanja slobodnih radikala zbog čega nastaje manje reaktivni flavonoidni fenoksidni radikal (reakcije 1 i 2) (Kazazić, 2004).



Reaktivne kisikove vrste (eng. *Reactive oxygen species- ROS*) se kontinuirano formiraju za vrijeme normalnih fizioloških procesa u organizmu ili kao posljedica izloženosti vanjskim utjecajima kako što su X-zrake, ozon, dim cigarete, zagađeni zrak, industrijske kemikalije, lijekovi (Halliwell i Gutteridge, 1989). Reaktivne kisikove vrste oštećuju ključne biomolekule kao što su nukleinske kiseline, lipidi, proteini, polinezasićene masne kiseline i ugljikohidrati. Također, mogu uzrokovati oštećenja DNA koja mogu dovesti do mutacija. Ako reaktivne kisikove vrste nisu efektivno uklonjene mogu stimulirati lančane reakcije slobodnih radikala koji naknadno oštećuju stanične biomolekule i na kraju dovode do bolesti (Halliwell i Gutteridge, 1990). Kada proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta nadmaši antioksidativnu obranu koju pružaju antioksidansi i antioksidativni enzimi u organizmu, dolazi do stanja koje se naziva oksidativni stres. Oksidativni stres dovodi do staničnog oštećenja te je jedan od uzročnika mnogih kroničnih degenerativnih bolesti (Prior i Xu, 2013).

2.2.2. Antioksidativna aktivnost

Antioksidansi su spojevi koji neutraliziraju slobodne radikale na način da im doniraju jedan od svojih elektrona. Međutim, antioksidans predajom elektrona ne postaje slobodni radikal, već i u takvoj formi ostaje stabilan (Singh i sur., 2013). Poznato je da antioksidansi, nenutritivne tvari imaju značajan ulogu u obrambenom mehanizmu organizma. Antioksidansi štite ljudsko tijelo od slobodnih radikala, usporavaju napredak mnogih kroničnih bolesti i lipidnu peroksidaciju. Antioksidansi u hrani se koriste kako bi zaštitili od štetnih učinaka oksidacije i također se koriste kao dodatak prehrani kako bi neutralizirali štetne učinke oksidativnog stresa. Posljednjih godina sve je veći interes za istraživanje biljnih antioksidansa zbog njihovog povoljnog učinka na zdravlje. Brojna epidemiološka istraživanja su pokazala inverznu povezanost između unosa voća i povrća i smrtnosti od kroničnih bolesti zbog njihove antioksidativne aktivnosti (Eberhardt i sur., 2000; Ganesan i sur., 2011).

Antioksidansi mogu biti enzimi ili različite male neenzimatske molekule kao što su fenoli, glutation, askorbinska kiselina. Vitamini i polifenoli su važne komponente u voću i povrću koje imaju antioksidativnu aktivnost. Polifenoli su izvrsni antioksidansi jer sadrže fenolnu skupinu (aromatski prsten s jednom hidroksilnom skupinom) koja može primiti elektron stvarajući pritom fenoksil-radikal koji je relativno stabilan radikal. Antioksidativna aktivnost

polifenola ovisi o kemijskoj strukturi i prostornom rasporedu supstituenata (Cao i sur., 1997). Razvijene su brojne mjerne metode kojima se određuje antioksidacijska aktivnost hrane. Zbog kompleksnih oksidacijskih procesa potrebno je koristiti više metoda kako bi dobili pouzdane rezultate, kao što su Briggs-Rauscher metoda, DPPH metoda, FRAP metoda, ABTS metoda, ORAC i TEAC metoda.

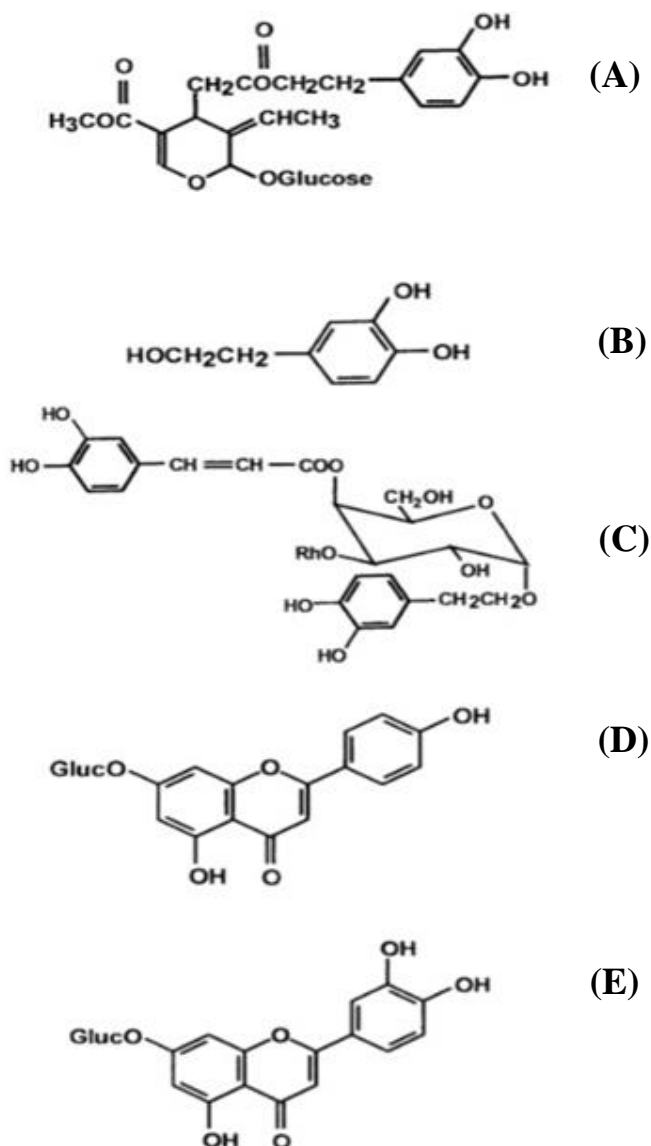
2.2.3. Fenolni spojevi lista masline

Fenolni spojevi nalaze se u svim dijelovima masline ali njihova koncentracija uvelike varira između različitih tkiva. List masline sadrži vrlo visoke koncentracije fenolnih spojeva. Dokazano je da fenolni spojevi iz lista masline imaju visoku bioraspoloživost. Vissers i suradnici (2002) su otkrili su da je apsorpcija hidroksitrola i oleuropeina kod ljudi iznosi 55-60 %.

List je primarno mjesto metabolizma biljaka na razini primarnih i sekundarnih biljnih metabolita te je sve više istraživanja o sastavu lista masline jer se smatra potencijalnim izvorom biološki aktivnih komponenti (Antolovich i sur., 2000). Fenolni spojevi u listu masline su brojni i raznolike prirode. Listovi masline imaju najveći antioksidativni učinak među različitim dijelovima masline. Sadržaj oleuropeina u maslinovom ulju kreće se između 0,005 % i 0,12 % dok ga je u maslinovom lišću od 1 % do 14 % (Japón-Luján i sur., 2006). Međutim, postoji nekoliko čimbenika koji utječu na udio polifenola u listu masline starost lista, stupanj zrelosti, zemljopisno podrijetlo, sorta, fenološki stadij tijekom uzorkovanja, udio mrvica na stablu, sadržaj vlage te stupanj onečišćenja tla.

Fenolni spojevi prisutni u listovima maslina su oleuropeozidi (oleuropein i verbascosid), flavoni (luteolin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, luteolin i diosmetin), flavonoli (rutin), flavan-3-oli (katehin) i supstituirani fenoli (tirozol, hidroksitrosol, vanilin, vanillična kiselina i kafeinska kiselina). Najbogatiji sastojak u maslinovim listovima je oleuropein, nakon čega slijedi hidroksitrosol, flavon-7-glukozid, luteolin, apigenin te verbascosid (El i Karakaya., 2009). Kemijske strukture najzastupljenijih fenolnih komponenti u ekstraktu lista masline prikazane su na slici 2. Međutim, nekoliko čimbenika može utjecati na kvantitativni i kvalitativni sastav fenola u maslinovom lišću kao što su uvjeti sušenja, zona uzgoja, postupak ekstrakcije i kultivari (Bilgin i Sahin , 2013; Rafiee i sur., 2011).

Oleuropein je sekoiridoidni spoj, prisutan je u cijeloj maslini (*Olea europaea L.*) i njezinim derivatima. Oleuropein je glavni bioaktivni spoj u lišću masline s jakim antioksidacijskim djelovanjem. Bourquelot i Vintilesco otkrili su ovaj spoj 1908. godine (Benavente-Garcia i sur., 2000). Istraživanja su pokazala da oleuropein ima povoljan učinak na zdravlje kao što je antioksidativni učinak (Benavente-Garcia i sur., 2000), antimikrobni (Pereira i sur., 2007), antivirusni, protuupalni, hipoglikemijski, hipolipidemijski učinak (Jemai i sur., 2008). Također, oleuropein je pokazao kardioprotektivan i neuroprotektivan efekt (Andreadou i sur., 2006; Omar, 2010). Oleuropein i produkti hidrolize su u stanju inhibirati razvoj i proizvodnju enterotoksina B od *Staphylococcus aureus*, razvoj *Salmonella enteritidis* i klijanje i posljedični razvoj spora *Bacillus cereus* (Bisignano i sur., 1999). Vodeni ekstrakti maslinovih listova ispitani su na antimikrobnu aktivnost protiv *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* (Gram +), *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* (Gram-) bakterija i *C. albicans* i *C. neoformans* (gljive). Osim zabrinutosti zbog degradacije kakvoće hrane, ti mikroorganizmi mogu biti uzročnici crijevnih infekcija kod ljudi. Ekstrakt je inhibirao rast svih ispitanih bakterija i gljivica, što upućuje na široku antimikrobnu aktivnost ekstrakta lista masline na način koji ovisi o koncentraciji (Periere i sur., 2007).



Slika 2. Kemijske strukture najzastupljenijih fenolnih komponenti u ekstraktu lista masline: (A) oleuropein, (B) hidroksitrosol, (C) verbascosid, (D) apigenin-7-glukozid, (E) luteolin-7-glukozid (Benavente-Garcia i sur., 2000).

2.3. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz lista masline

Ekstrakcija bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala je prvi korak u korištenju bioaktivnih komponenti u pripremi dodataka prehrani, lijekova i kozmetičkih proizvoda (Dai i Mumper, 2010). Fenolni spojevi mogu se ekstrahirati iz svježih, smrznutih ili sušenih biljnih uzoraka. Prije ekstrakcije biljni uzorci se suše zrakom ili smrzavanjem te se melju i homogeniziraju. Općenito sušenje smrzavanjem zadržava veću količinu fenolnih spojeva od sušenja biljnih uzorka zrakom (Abascal i sur., 2005).

Učinkovitost ekstrakcije određena je vrstom otapala, vremenom ekstrakcije, temperaturom, omjerom uzorka i otapala te kemijskim sastavom i fizikalnim obilježjima uzorka. Najčešće korištena otapala za ekstrakciju su metanol, etanol, aceton, etil acetat, vodene otopine alkohola, a odabir otapala utječe na količinu i brzinu izlučivanja polifenola (Xu i Chang, 2007). Također, kao ekstrakcijsko otapalo koristi se i voda zbog smanjenja korištenja organskih otapala te troškova ekstrakcije (Cacace i Mazza, 2002).

Ne postoji univerzalni postupak ekstrakcije pogodan za ekstrakciju svih fenolnih spojeva već se odabire metoda ovisno o željenoj skupini polifenola ili pak o svojstvima materijala iz kojeg se izoliraju. Fenolni spojevi bit će ekstrahirani iz biljnog uzorka ovisno o otapalu koje se koristi tijekom izvođenja te smjesi fenola topivih u otapalu.

Istraživanja su pokazala da je metanol kao otapalo učinkovitiji u ekstrakciji polifenola niže molekulske mase dok se polifenoli veće molekulske mase bolje ekstrahiraju vodenom otopinom aceton (Labarbe i sur., 1999). Međutim od ključne je važnosti odabir metode ekstrakcije zbog održavanja stabilnosti fenolnih spojeva. Ekstrakcija antocijana se provodi pri temperaturama u rasponu od $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ jer se pri temperaturi iznad $T = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ događa degradacija antocijana (Havlikova i Mikova, 1985).

Nedostaci konvencionalnih metoda ekstrakcije su niska učinkovitost, potencijalno onečišćenje okoliša zbog velikih količina organskih otapala, dugotrajan proces ekstrakcije (Dai i Mumper, 2010) te je sve veći cilj ispitivanje i provođenje novih tehnika ekstrakcije. Međutim, teško je razviti jednu metodu za optimalnu ekstrakciju svih fenolnih spojeva zbog polariteta fenolnih spojeva koji značajno variraju (Garcia i sur., 2010). Posljednjih nekoliko godina istraživanja su usmjerena prema razvoju novih metoda ekstrakcije. Neke od tehnika opisanih u literaturi su :

- ubrzana ekstrakcija otapalima (eng. *Accelerated Solvent Extraction, ASE*),
- ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *Microwave-Assisted Extraction, MAE*),
- ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (eng. *High Pressure Assisted Extraction, HPAE*),
- ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. *Ultrasound Assisted Extraction, UAE*),
- ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem (engl. *High Voltage Electrical Discharge, HVED*)

- ekstrakcija superkritičnim fluidom (eng. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE) (Abaza i sur., 2015).

Glavne prednosti novih tehnika ekstrakcije su smanjenje vremena ekstrakcije, smanjenje volumena otapala te povećanje učinkovitosti ekstrakcije.

2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima predstavlja novu tehniku koja koristi energiju mikrovalova kako bi se olakšao prijenos željenih spojeva iz matrice uzorka u otapalo. Prednosti ove tehnike su ubrzavanje i skraćivanje vremena ekstrakcije, smanjenje volumena organskih otapala, poboljšana učinkovitost i automatizacija procesa (Spingo i Faveri, 2009). Mikrovalna ekstrakcija se smatra potencijalnom alternativom tradicionalnoj ekstrakciji kruto-tekuće za ekstrakciju metabolita iz biljaka. Učinkovitost ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ovisi o odabiru otapala za topljivost ciljanog analita, interakciji između otapala i supstrata za ekstrakciju, mikrovalnim apsorpcijskim svojstvima otapala uključujući dielektričnu konstantu (sposobnost apsorpcije mikrovalne energije), dielektričnom gubitku (učinkovitost pretvaranja mikrovalne energije u toplinu) i faktoru raspršivanja (Jain i sur., 2009). Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je određena snagom i frekvencijom mikrovalova, trajanjem mikrovalne radijacije, količinom vlage i veličinom čestica u uzorku, tlakom i brojem ekstrakcijskih ponavljanja (Wang i Weller, 2006).

Quan i suradnici (2006) istraživali su ekstrakciju polifenola iz svježeg čaja te su uočili da se primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za $t = 6$ min postiže veći prinos nego primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u trajanju od $t = 60$ minuta uobičajene ili pak klasične ekstrakcije na sobnoj temperaturi tijekom $t = 24$ h.

2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Metodom ultrazvučne ekstrakcije bioaktivnih tvari nastoji se smanjiti upotreba otapala ili potpuno izbjegavati njihova upotreba. Ograničava se povišenje temperature tijekom tretmana te se dobiva veći prinos ekstraktivnih, bioaktivnih tvari. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti ultrazvukom (20-100 kHz) jedna je od novijih tehnika koje omogućuju visoku reproducibilnost u kraćem vremenu (Caili i sur., 2006), jednostavnije rukovanje, niže

temperature te korištenje manjih količina otapala. Tijekom tretiranja ultrazvukom kavitacija uzrokuje bubrenje stanica te probijanje staničnih stjenki (Vinatoru, 2001), što omogućuje visoke brzine difuzije kroz staničnu stjenku te jednostavnije ispiranje sastojaka stanice. Uz otapalo, temperaturu i tlak, za optimiranje procesa potrebno je dobro posložiti faktore ultrazvučnog tretiranja poput frekvencije, vremena tretiranja, snage ultrazvuka te distribucije ultrazvučnih valova. Da bi se postigao maksimalan prinos potrebno je optimirati uvjete temperature, snage ultrazvuka te izbor otapala (Wang i Weller, 2006).

Ekstrakcija ovisi o primijenjenoj frekvenciji, intenzitetu ultrazvuka, vremenu tretiranja i polarnosti medija, koji može biti čista otopina ili smjesa otapala. Pri nižim frekvencijama dominira fenomen kavitacije, koji uzrokuje mikrorupture staničnog materijala, tj. stijenki, tako omogućivši prodiranje otapala u biomaterijal i povećavajući prijenos mase (Drmić i Jambrak, 2010).

Mikrovalnom ekstrakcijom ili ekstrakcijom u kombinaciji ultrazvuka i mikrovalova, moguće je dobiti slične udjele ekstrahiranih tvari kao i standardnim metodama ali uz puno kraće vrijeme, što je energetski i ekonomski isplativo (Abert i sur., 2008). Međutim, potrebno je obratiti pažnju i na negativne učinke primjene mikrovalova i ultrazvuka kao što su povišene temperature što može negativno utjecati na bioaktivne spojeve i kvalitetu ekstrahiranog materijala (Blekić i sur., 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

- List masline (*Olea europea* L.) iz Šibensko-Kninske županije; berba 2015, (Suban, Hrvatska)

3.1.2. Otapala i reagensi

- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH, $C_{18}H_{12}N_5O_6$), Sigma-Aldrich, Njemačka
- 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS, $C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$), Sigma-Aldrich Co., Njemačka
- 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazin (TPTZ, $C_{18}H_{12}N_6$), Sigma-Aldrich, Švicarska
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox, $C_{14}H_{18}O_4$), Sigma-Aldrich Co., Rusija
- etanol (C_2H_5OH), 96%-tni, Carlo Erba Reagents S.A.S, Italija
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina (galna kiselina, $C_6H_2(OH)_3COOH$), 98 %, AcrosOrganics, SAD
- kalijev jodat (KIO_3), Fisher Chemical, Velika Britanija
- kalije vperoksodisulfat ($K_2S_2O_8$), Fluka, Švicarska
- klorovodična kiselina (HCl), Carlo Erba Reagents S.A.S, Francuska
- koncentrirana octena kiselina (CH_3COOH), T.T.T.d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska
- koncentrirana sulfatna kiselina (H_2SO_4), Carlo ErbaA Reagents S.A.S, Francuska
- kvarcni pijesak, veličine čestica 0,1-0,6 mm
- malonska kiselina ($C_3H_4O_4$), Fisher Chemical, UK
- manganov sulfat ($MnSO_4$), AcrosOrganics, SAD
- metanol (CH_3OH), p.a., J.T.Baker, Nizozemska
- natrijev acetat-trihidrat ($CH_3COONa \times 3H_2O$), J.T.Baker, Nizozemska
- natrijev dihidrogen fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$), Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- natrijev karbonat (Na_2CO_3), Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska
- škrob ($C_6H_{10}O_5$)_n, Fisher Chemical, UK
- vodikov peroksid (H_2O_2), 30% , Gram Mol, Zagreb, Hrvatska

- željezo(II)-sulfat-heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), SigmaAldrich, Njemačka
- željezo(III)-klorid-heksahidrata ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), Gram Mol, Zagreb, Hrvatska

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- analitička vaga (Sartorius TE214-S0CE, Njemačka)
- eksikator (Normax, Portugal)
- konduktometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)
- laboratorijski sušionik (InkoLab ST60T, Hrvatska)
- magnetska miješalica (Heidolph Instruments, Njemačka)
- mikroskop (Motic B1-220A, binokularni, Njemačka)
- Mikrovalno-ultrazvučni ekstraktor/reaktor (Lab Kits)
- pH metar (Jenco 601A, SAD)
- potenciometar (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska)
- spektrofotometar (Biochrom Libra S12, Engleska)
- termometar (UNI-T UT33C digitalni multimetar, Poljska)
- uljna-vodena kupelj s integriranom miješalicom (HBR 4 digital, IKA-Werke, Njemačka)
- vorteks (Biosan Vortex V1 Plus, Latvija)

Pribor:

- aluminijske posudice
- filter papir
- kiveta od kvarcnog stakla
- menzure volumena 100 mL i 200 mL
- metalna špatulica za vaganje
- mikropipete volumena 10 - 100 μL , 100 -1000 μL , 0,5 – 5 mL i 1 – 10 mL
- odmjerna tikvica, volumena 10 mL, 100 mL, 200 mL, 250 mL i 500 mL
- plastične kivete
- staklene čaše volumena 100 mL, 200 mL i 250 mL
- staklene epruvete
- stakleni lijevci

3.2. METODE

3.2.1. Usitnjavanje suhih listova biljke masline

Da bi se dobile različite frakcije veličina čestica lista masline, provodi se mljevenje upotrebom mlina IKA Tube Mill (IKA, Njemačka) pri brzini okretaja oštrice od $rpm = 15000 \text{ min}^{-1}$. Vrijeme mljevenja se prilagođava u skladu s veličinom čestica koja se želi dobiti ($t = 10 - 40 \text{ s}$). Odmah nakon mljevenja, frakcije se odvajaju prosijavanjem.

3.2.2. Prosijavanje pripremljenih usitnjenih listova masline

Prosijavanje se provodi upotrebom standardiziranih DIN sita (Fritsch, Njemačka) promjera pora $d = 1000, 800, 500, 355, 250 \text{ i } 100 \text{ }\mu\text{m}$. Sita se poslažu na laboratorijsku tresilicu Analysette 3 Pro (Fritsch, Njemačka) te se provodi tresenje u trajanju od $t = 10 \text{ min}$ u intervalima od po $t = 3 \text{ s}$ i amplitudom od 3 mm . Nakon prosijavanja frakcije se maknu sa sita i svaka se pakira u zasebnu ambalažu. Za daljnja istraživanja uzete su frakcije s promjerima čestica od $d = 500, 350 \text{ i } 100 \text{ }\mu\text{m}$.

3.2.3. Klasična ekstrakcija biološki aktivnih komponenti

Ekstrakcija biološki aktivnih komponenta bazira se na denaturaciji stanične membrane i otpuštanju molekula s biološkom aktivnošću (Kaushik i sur., 2010). U staklenu čašu volumena $V = 200 \text{ mL}$ odvaže se $m = 1 \text{ g}$ usitnjenog osušenog lista masline te se prelije s $V = 50 \text{ mL}$ destilirane vode zagrijane na unaprijed definiranu temperaturu. Pripremljena ekstrakcijska smjesa termostatira se na definiranoj temperaturu u uljnoj kupelji pri određenoj brzini miješanja zadano vrijeme. Eksperimenti ekstrakcije provedeni su prema uvjetima definiranim planom pokusa primjenom metode odzivnih površina (Tablica 1). Nakon isteka vremena ekstrakcije, uzorak se profiltrira kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze. Nakon provedene ekstrakcije ekstraktima su određena fizikalna i kemijska svojstva

Tablica 1. Plan eksperimenata (klasična ekstrakcija)

Redni broj eksperimenta	t / min	$T / ^\circ\text{C}$	$\text{rpm} / \text{min}^{-1}$	$d / \mu\text{m}$
1	5	40	500	300
2	15	40	500	300
3	5	80	500	300
4	15	80	500	300
5	10	60	250	100
6	10	60	750	100
7	10	60	250	500
8	10	60	750	500
9	10	60	500	300
10	5	60	500	100
11	15	60	500	100
12	5	60	500	500
13	15	60	500	500
14	10	40	250	300
15	10	80	250	300
16	10	40	750	300
17	10	80	750	300
18	10	60	500	300
19	5	60	250	300
20	15	60	250	300
21	5	60	750	300
22	15	60	750	300
23	10	40	500	100
24	10	80	500	100
25	10	40	500	500
26	10	80	500	500
27	10	60	500	300

3.2.4. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenti potpomognuta mikrovalovima te mikrovalovima i ultrazvukom

Eksperimenti ekstrakcije biološki aktivnih komponenta potpomognuti mikrovalovima te mikrovalovima i ultrazvukom provedeni su u mikrovalno-ultrazvučni ekstratoru/reaktoru (Lab Kits). Analiziran je utjecaj mikrovalova te sinergije mikrovalova i ultrazvuka (50W) na učinkovitost ekstrakcije biološki aktivnih komponenta iz lista masline. U Erlenmayer-ovu tikvicu s metalnim produžetkom za prijenos ultrazvučnih valova doda se $V = 50 \text{ mL}$ destilirane vode zagrijane na određenoj temperaturi te $m = 1 \text{ g}$ usitnjenog lista masline. Uvjeti provedbe eksperimenta prikazani su u tablici 2. Nakon provedene ekstrakcije uzorak se profiltrira kako bi se odvojio vodeni ekstrakt od krute faze. Nakon provedene ekstrakcije ekstraktima su određena fizikalna i kemijska svojstva

Tablica 2. Plan eksperimenata (mikrovalna ekstrakcija i mikrovalna ekstrakcija uz ultrazvuk)

Redni broj eksperimenta	P / W	t / min	$d / \mu\text{m}$	$T / ^\circ\text{C}$
1	400	5	300	60
2	800	5	300	60
3	400	15	300	60
4	800	15	300	60
5	600	10	100	40
6	600	10	500	40
7	600	10	100	80
8	600	10	500	80
9	600	10	300	60
10	400	10	300	40
11	800	10	300	40
12	400	10	300	80
13	800	10	300	80
14	600	5	100	60
15	600	15	100	60
16	600	5	500	60
17	600	15	500	60
18	600	10	300	60
19	400	10	100	60

20	800	10	100	60
21	400	10	500	60
22	800	10	500	60
23	600	5	300	40
24	600	15	300	40
25	600	5	300	80
26	600	15	300	80
27	600	10	300	60

3.2.5. Određivanje fizikalnih svojstava ekstrakata

pH

pH vrijednosti pripremljenih vodnih ekstrakata lista masline izmjerene su pH metrom (Jenco 601A, SAD) u dvije paralele.

Vodljivost i ukupna otopljena suha tvar (TDS)

Vodljivosti i ukupne otopljene suhe tvari pripremljenih vodnih ekstrakata lista masline izmjerene su konduktometrom (SevenCompact, MettlerToledo, Švicarska) u dvije paralele.

3.2.6. Određivanje suhe tvari standardnom metodom sušenja

Ukupnu suhu tvar čini cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Standardnom metodom sušenja određuje se ostatak nakon sušenja na $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase (AOAC, 1995). U suhu i označenu posudicu stavi se kvarcni pijesak (u količini dovoljnoj da prekrije dno posudice). Posudica se suši u sušioniku sa skinutim poklopcem na temperaturi $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon sušenja od $t = 1\text{ h}$ poklopci se stave na posudice, izvade iz sušionika i hlade oko pola sata u eksikatoru, a zatim se važu s točnošću $\pm 0,0002\text{ g}$. U ohlađene i izvagane aluminijske posudice zajedno s kvarcnim pijeskom otpipetira se volumen od $V = 3\text{ mL}$ ekstrakta (dvije paralele za svaki uzorak). Sušenje uzoraka traje $t = 4\text{ h}$ pri temperaturi $T = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$ u sušioniku s automatskom regulacijom temperature, pri čemu posudice moraju biti otvorene. Kada je sušenje završeno, posudice se zatvore u sušioniku i prenesu u eksikator gdje se hlade na sobnoj temperaturi te se zabilježi konačna masa za izračun udjela suhe tvari, odnosno vode.

Izračun i izražavanje rezultata:

Udio vode u uzorcima izračuna se iz gubitka mase prema formuli (jednadžbe 1-2):

$$\%vode = \frac{(A - B)}{m} \cdot 100\% \quad [1]$$

$$\% \text{ suhe tvari} = 100 \% - \% \text{ vode} \quad [2]$$

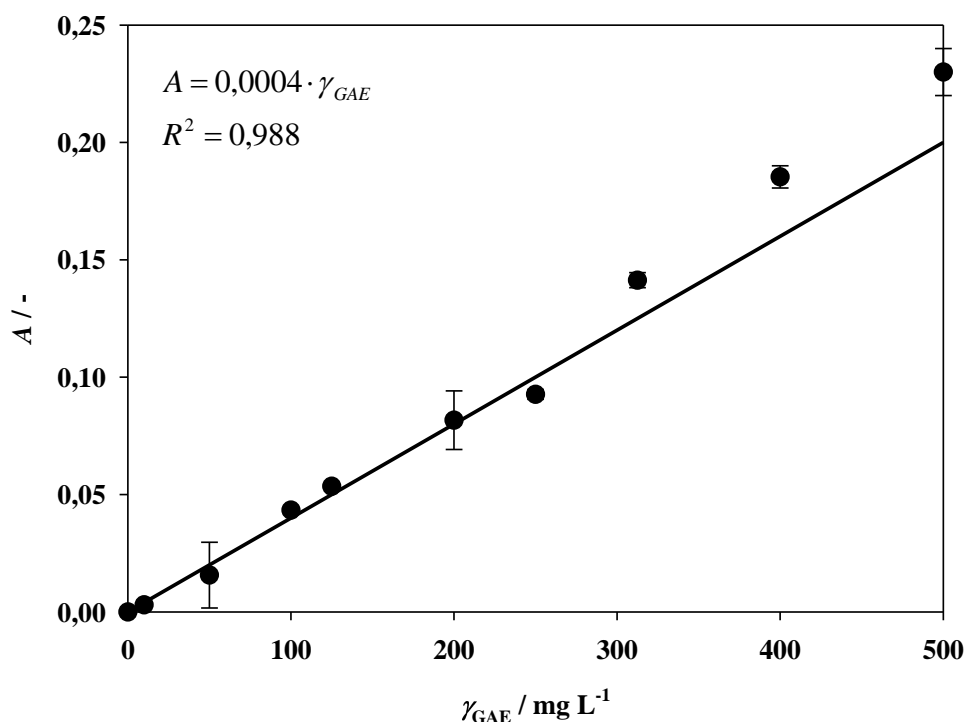
gdje je A masa posudice s uzorkom prije sušenja (g), B masa posudice s uzorkom nakon sušenja (g), a m masa uzorka (g).

Na istom ispitnom uzorku moraju se obaviti najmanje 2 određivanja, koja se ne smiju razlikovati više od 0,2 % obzirom na udio vode odnosno udio suhe tvari.

3.2.7. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli određeni su spektrofotometrijski prema metodi koja se temelji na kolorimetrijskoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin- Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibden i fosfomolibden kiseline, koji reagira s fenoksid ionom iz uzorka, prilikom čega se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenog volframovog i molibdenovog oksida. Intenzitet nastalog plavog obojenja određuje se spektrofotometrijski pri $\lambda = 765 \text{ nm}$ i proporcionalan je udjelu polifenolnih spojeva u uzorku (Pinelo i sur., 2005).

U epruvetu se otpipetira $V = 7,9 \text{ mL}$ destilirane vode, $V = 100 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka, $V = 500 \text{ }\mu\text{L}$ Folin-Ciocalteu reagensa i $V = 1,5 \text{ mL}$ 20%-tne otopine Na_2CO_3 . Nakon dodatka 20%-tne otopine Na_2CO_3 pokreće se reakcija te uzorci stoje 2 h na sobnoj temperaturi, nakon čega se mjeri apsorbancija razvijenog plavog obojenja pomoću spektrofotometra na $\lambda = 765 \text{ nm}$. Osim uzoraka priprema se i slijepa proba, na isti način kao i reakcijska smjesa za uzorke samo što umjesto uzorka sadrži $V = 100 \text{ }\mu\text{L}$ destilirane vode. Za svaki uzorak pripremaju se dvije paralelne probe, a kao rezultat se uzima srednja vrijednost. Sadržaj ukupnih polifenola u pojedinim uzorcima određen je na osnovu jednadžbe baždarnog pravca galne kiseline ($\gamma_{\text{GAE}} = 0 - 500 \text{ mg L}^{-1}$) (slika 3), a rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu suhe tvari uzorka.



Slika 3. Baždarni pravac za određivanje koncentracije ukupnih polifenola

3.2.8. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

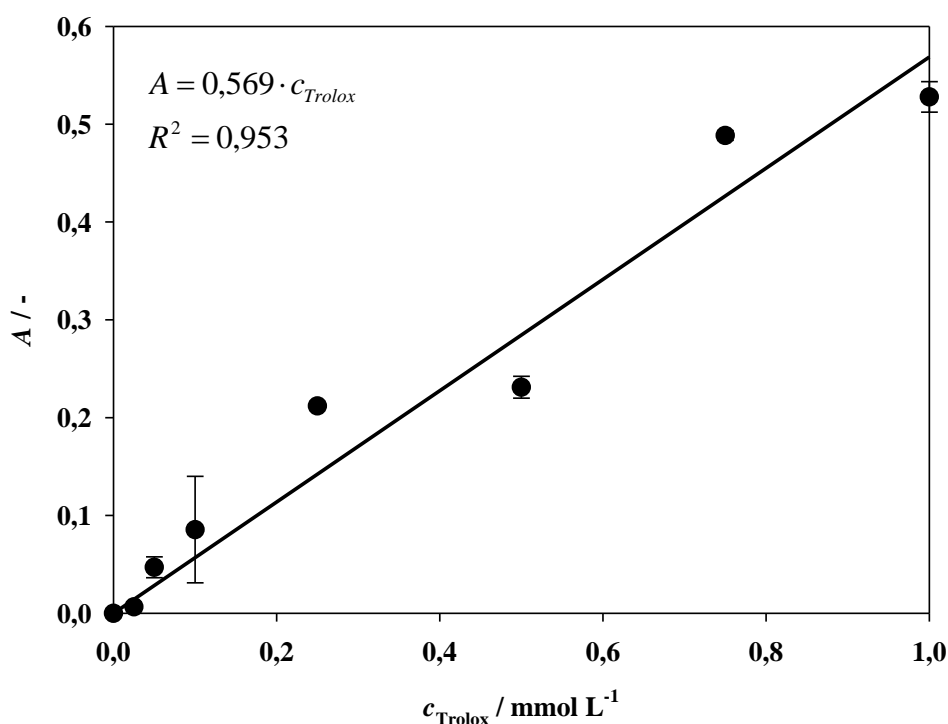
U okviru ovog rada antioksidacijski kapacitet pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline određene je primjenom slijedećih metoda:

- ABTS⁺ metoda [radikal kation 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (Re i sur., 1999);
- DPPH metoda (reakcija s 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom) (Brand-Williams i sur., 1995);
- FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power) (Benzie i Strain, 1996);

3.2.8.1. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Metoda se temelji na „gašenju“ plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline), koji se formira bilo kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a (Re i sur., 1999) nekoliko sati prije analize. Dodatak antioksidansa izaziva gubitak boje, a ta se promjena detektira spektrofotometrijski pri valnoj

duljini od $\lambda = 734$ nm. Udio ABTS radikala koje „gase“ različiti antioksidansi mjeri se praćenjem smanjenja apsorbanije ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbanije koju uzrokuje dodatak određene količine 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilne kiseline (Trolox), analoga vitamina E topljivog u vodi pri istim uvjetima. Za određivanje antioksidacijskog kapaciteta pripremi se otopina ABTS radikala, oksidacijom vodene otopine ABTS koncentracije $c = 7 \text{ mmol L}^{-1}$ s amonijevim peroksodisulfatom koncentracije $c = 140 \text{ mmol L}^{-1}$. Pripremljena otopina ostavi se stajati preko noći, a zatim se razrijedi 96% etanolom do konačne koncentracije ABTS radikala od 1 %, tako da apsorbanija te otopine iznosi $0,7 \pm 0,02$. Alikvot od $V = 40 \mu\text{L}$ razrijeđenih uzoraka pomiješa se s $V = 4 \text{ mL}$ otopine ABTS radikala te se izmjeri apsorbanija nakon 6 minuta u odnosu na slijepu probu. Slijepu proba umjesto uzorka sadržava etanol u istoj količini. Antioksidacijska aktivnost pojedinih uzoraka određena je na osnovu jednadžbe baždarnog pravca Trolox-a ($c_{\text{Trolox}} = 0 - 1 \text{ mmol L}^{-1}$) (slika 4), a rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka (Re i sur., 1999).

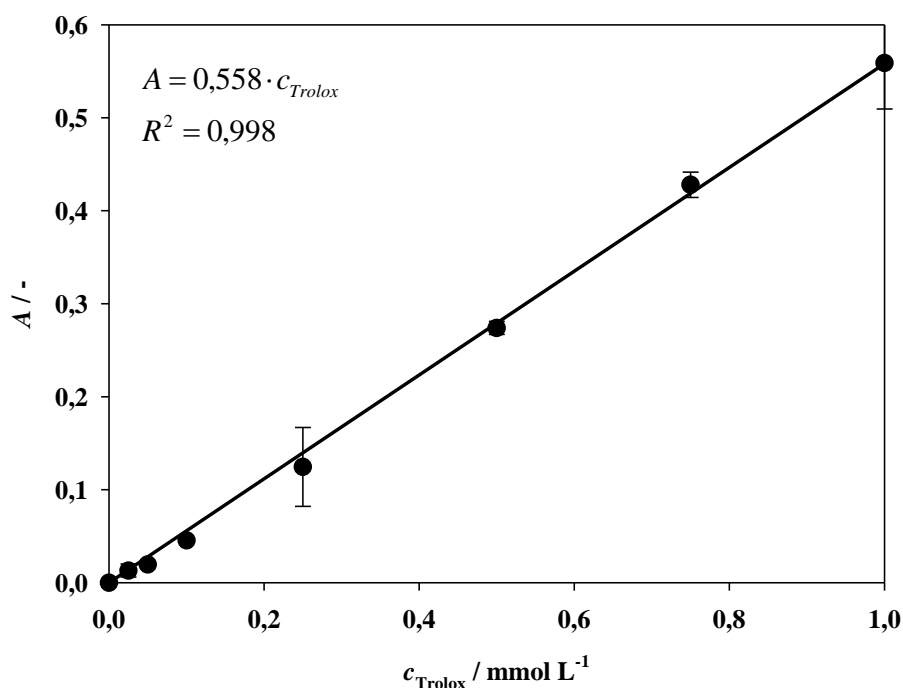


Slika 4. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom ABTS metode

3.2.8.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Ova metoda temelji se na redukciji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolnoj otopini. DPPH radikal radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (515 nm), dok u prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji „gasi“ slobodne radikale) dolazi do stabilizacije DPPH radikala sparivanjem elektrona te do promjene ljubičaste boje (oksidirani oblik radikala) otopine u žutu (reducirani oblik radikala), što se mjeri promjenom apsorbanције reakcijske smjese u definiranom vremenu u odnosu na isti učinak koji se postiže s poznatim reducensom (Trolox) (Brand-Williams i sur., 1995).

Pripremi se otopina DPPH radikala u metanolu koncentracije $c = 0,094 \text{ mmol L}^{-1}$. U epruvetu se otpipetira $V = 100 \text{ }\mu\text{L}$ ispitivanog uzorka te se zatim doda $V = 3,9 \text{ mL}$ pripremljene otopine DPPH radikala u metanolu. Sve zajedno se dobro homogenizira. Reakcija se odvija 30 min u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija pri $\lambda = 515 \text{ nm}$ u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava jednaki volumen metanola. Iz konstruiranog baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o vrijednosti poznatih koncentracija Trolox-a ($c_{\text{Trolox}} = 0 - 1 \text{ mmol L}^{-1}$) (slika 5), određuje se vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih uzorka. Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta Trolox-a po gramu suhe tvari uzorka.

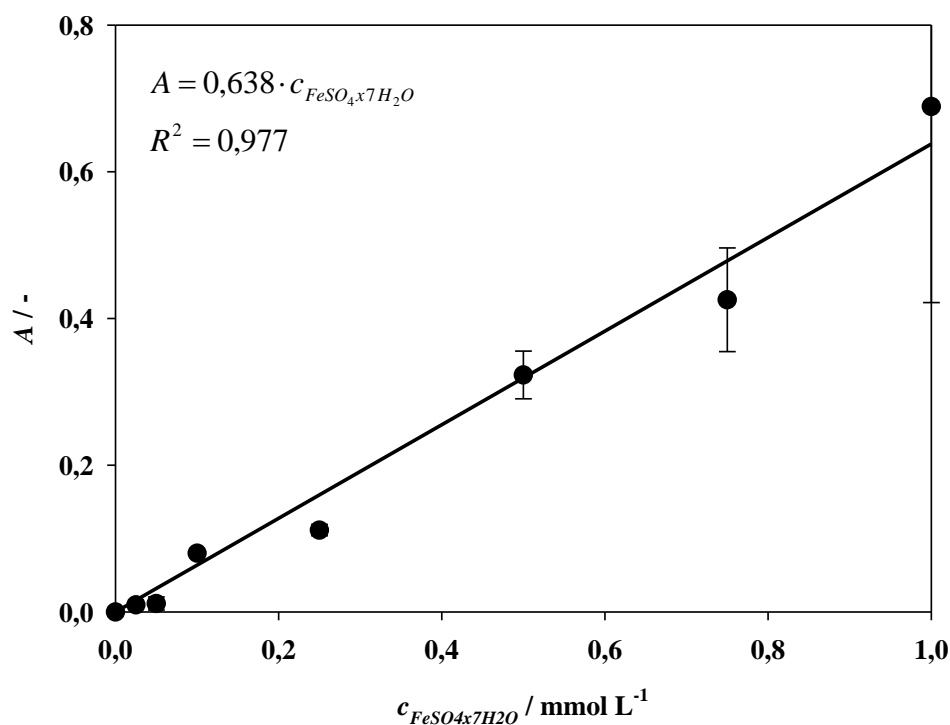


Slika 5. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode

3.2.8.3. FRAP metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti

Princip određivanja antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode temelji se na redukciji bezbojnog kompleksa željezo(III)-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) u fero formu (Fe^{2+}) intenzivne plave boje (Benzie i Strain, 1996). Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri $\lambda = 593 \text{ nm}$.

Za pripremu FRAP reagensa potrebno je pripremiti acetatni pufer koncentracije $c = 300 \text{ mmol L}^{-1}$, otopinu TPTZ-akoncentracije $c = 10 \text{ mmol L}^{-1}$ te vodenu otopinu željezo(III)-klorid-heksahidrata koncentracije $c = 20 \text{ mmol L}^{-1}$. FRAP reagens priprema se miješanjem $V = 25 \text{ mL}$ acetatnog pufera, $V = 2,5 \text{ mL}$ TPTZ-a i $V = 2,5 \text{ mL}$ željezo(III)-klorida-heksahidrata. U epruvetu se doda $V = 50 \mu\text{L}$ ispitivanog uzorka i $V = 950 \mu\text{L}$ FRAP reagensa te se izmjeri apsorbancija reakcijske smijese nakon $t = 4 \text{ minute}$. Slijepa proba umjesto uzorka sadržava jednaku količinu FRAP reagensa. Iz konstruiranog baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o vrijednosti poznatih koncentracija $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($c_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} = 0 - 1 \text{ mmol L}^{-1}$) (slika 6), određuje se vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ispitivanih uzorka. Rezultati se izražavaju kao mmol ekvivalenta $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ po gramu suhe tvari uzorka.



Slika 6. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom FRAP metode

3.2.9. Statistička analiza i matematičko modeliranje

3.2.9.1. Metoda odzivne površine za planiranje eksperimenata

Metoda odzivne površine (eng. *Response surface methodology*; *RSM*) analizira odnose između nekoliko ulaznih varijabli te jedne ili više varijabli odziva. Osnovni motiv za korištenje RSM metode je pronalaženje optimalnih uvjeta za dobivanje optimalnog odziva. Plan eksperimenata za optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih molekula iz lista masline izrađen je koristeći Box Behnken eksperimentalni dizajn u programskom paketu Statistica 13.0 (StatSoft, SAD). Box Behnken eksperimentalni dizajn zahtijeva minimalno tri parametra. Ispitan je utjecaj temperature, vremena ekstrakcije, brzine miješanja i veličine čestica na učinkovitost ekstrakcije biološki aktivnih molekula primjenom klasičnog ekstrakcijskog procesa. Ispitan je također utjecaj temperature, vremena ekstrakcije, veličine čestica te snage mikrovalova te dodatni utjecaj ultrazvuka snage $P=50 \text{ W}$ pri definiranim uvjetima mikrovalne ekstrakcije na učinkovitost ekstrakcije biološki aktivnih molekula primjenom mikrovalno/ultrazvučnog ekstraktora/reaktora. Svaka od varijabli analizirana je na

tri nivoa. Za 4 faktora na 3 nivoa algoritam predlaže 27 eksperimenata. Uvjeti pri kojima su provedeni eksperimenti prikazani su u tablicama 1-2.

Osnovna ideja metodologije odzivne površine je dobiti odnos utjecajnih faktora na zavisnu varijablu (odziv) kroz odzivnu funkciju. Metoda odzivne površine također omogućuje razlučivanje efekata pojedinih članova modela kao glavne efekte ili interakcije. U većini RSM problema, oblik veze između odziva i nezavisnih varijabli je nepoznat pa je prvi korak u RSM metodi traženje odgovarajuće aproksimacijske veze. Obično se koristi polinom nižeg reda u odgovarajućim područjima nezavisnih varijabli. Npr. funkcija modela prvog reda (jed.3) ili funkcija modela drugog reda (jed.4) u slučaju da postoji nelinearnost (Anderson-Cook i sur., 2009):

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \dots + \beta_k \cdot x_k + \varepsilon \quad [3]$$

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \varepsilon \quad [4]$$

gdje y predstavlja zavisnu varijablu, x nezavisne varijable, β koeficijente modela, a ε pogrešku koja se javlja u odzivu. Koeficijenti modela određuju se metodom minimiziranja sume kvadrata odstupanja, nakon čega se radi validacija odzivne površine na nezavisnom setu podataka.

3.2.9.2. Osnovna statistička analiza rezultata

Sva mjerenja u ovome radu provedena su u dvije paralele te je za njih provedena osnovna statistička analiza (srednja vrijednost, standardna devijacija, standardna pogreška) u programskom paketu Statistica 13.0. Međusobni odnosi ili povezanosti između fizikalnih i kemijskih karakteristika pripremljenih vodenih ekstrakata izabranih biljnih vrsta analizirani su na temelju korelacijske matrice u programskom paketu Statistica 13.0.

3.2.9.3. Multivarijantna analiza varijance (MANOVA)

Kako bi se ispitaio utjecaj ulaznih varijabli na izlazne varijable u svakoj od korištenih metoda ekstrakcija primijenjena je multivarijantna analiza varijance u programskom paketu XLSTAT. Multivarijantna analiza varijance testira razlike između dviju ili više nezavisnih

varijabli i dviju ili više zavisnih varijabli. Primjenjuje se u dva slučaja: (i) ako postoji nekoliko koreliranih zavisnih varijabli te se primjenjuje jedan test na čitavom setu varijabli umjesto nekoliko pojedinačnih testova te (ii) kad se želi ispitati kako nezavisne varijable utječu na odziv zavisnih varijabli.

3.2.9.4. Analiza osnovnih komponenata (PCA)

Fizikalna i kemijska svojstva pripremljenih ekstrakata lista masline sa sve tri korištene metode ekstrakcije analizirana su primjenom metode glavnih komponenata (eng. *Principal Component Analysis*, PCA) u programskom paketu XLSTAT.

Metoda glavnih komponenata je najjednostavnija metoda multivarijatne statistike koju možemo definirati kao alat za pronalaženje sličnosti i različitosti između podataka. Cilj PCA je konstrukcija novog koordinatnog sustava s manjim brojem dimenzija od izvornog koji naglašava glave uzroke varijacija podataka. PCA se primjenjuje za:

- redukciju dimenzionalnosti podataka (reducira broj izvornih varijabli na mali broj indeksa koji su linearna kombinacija izvornih varijabli i zovu se glavne komponente analizira korelacije unutar jednog skupa varijabli i pojedinačne redukcije dimenzionalnog prostora, kako bi se što veći broj varijabli objasnio pomoću što manjeg broja varijabli)
- interpretaciju podataka (glavne komponente objašnjavaju varijabilnost podataka na najkoncizniji način, na taj način pokazuje neke skrivene povezanosti, međuodnose podataka. Podaci se prikazuju na način koji nije uobičajen, ali sadrži mnogo bitnih informacija o skupu izvornih podataka)

Ako su X_1, X_2, \dots, X_p svojstva varijabli mjerenih na n objekata (sva mjerenja se prikazuju $n \times p$ matricom) tada primjenom PCA analize treba naći Y_1, Y_2, \dots, Y_p tako da su nekorelirani i da vrijedi $\text{Var}(Y_1) \geq \text{Var}(Y_2) \geq \dots \text{Var}(Y_p)$ gdje su Y_i glavne komponente.

3.2.9.5. Modeli lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije, postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima te postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom

Za previđanje fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije, postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima te postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom na temelju ulaznih parametra pojedinog postupka razvijeni su modeli lokalne linearne regresije. Metoda lokalne linearne regresije zasniva se na višestrukoj minimizaciji razlike između predikcije modela i eksperimentalnih vrijednosti pojedine izlazne varijable. Metoda procjenjuje dvije zasebne linearne regresijske jednadžbe; jednu za predikciju izlaznih veličine (y) većih ili jednakih točki prijeloma (b_0) i jednu za vrijednosti izlaznih veličina većih od točke prijeloma (jed.5):

$$y = (b_{01} + b_{11} \cdot x_1 + \dots + b_{m1} \cdot x_m) \cdot (y \leq b_n) + (b_{02} + b_{12} \cdot x_1 + \dots + b_{m2} \cdot x_m) \cdot (y \geq b_n) \quad [5]$$

Parametri modela lokalnih linearnih regresijskih modela procijenjeni su u programskom paketu Statistica 13.0.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom klasične ekstrakcije

4.1.1. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije

Proveden je postupak ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom klasične ekstrakcije. U svrhu definiranja procesnih uvjeta klasične ekstrakcije koji bi osigurali optimalne vrijednosti koncentracije polifenola i antioksidacijske aktivnosti napravljen je plan eksperimenata primjenom metodologije odzivnih površina (RSM). Analiziran je utjecaj četiri varijable (temperatura, vrijeme procesa, promjer čestica i brzina miješanja) na tri nivoa. Eksperimentalno određene vrijednosti fizikalnih svojstava (pH, TDS, vodljivost i udio suhe tvari) te kemijska svojstva (ukupni polifenoli i antioksidacijska aktivnost određena ABTS, DPPH i FRAP metodom) u 27 provedenih eksperimenata prikazani su u tablici 3. Analizom eksperimentalnih rezultata može se uočiti da je pH vrijednost približno jednaka u svim ekstraktima lista masline pripremljenim postupkom klasične ekstrakcije. Najniža vrijednost ukupnih otopljenih tvari (TDS) i vodljivosti izmjerena je za eksperiment broj 1 ($t = 5$ min, $T = 40$ °C, $rpm = 500$ min⁻¹ i $d = 300$ μm), a najviša vrijednost ukupnih otopljenih tvari (TDS) i vodljivosti izmjerena je za eksperiment broj 4 ($t = 15$ min, $T = 80$ °C, $rpm = 500$ min⁻¹ i $d = 300$ μm). Kod svih pripremljenih ekstrakata lista masline uočen je trend porasta ukupnih otopljenih tvari (TDS) i vodljivosti porastom temperature ekstrakcije. Električna vodljivost očekivano je proporcionalna izmjerenim vrijednostima TDS-a kod svih ekstrakata.

Analiza rezultata kemijskih analiza prikazana u tablici 3 pokazala je da je najveća količina ukupnih polifenola ekstrahirana u eksperimentu broj 4 ($t = 15$ min, $T = 80$ °C, $rpm = 500$ min⁻¹ i $d = 300$ μm) $UF = 194,272 \pm 3,271 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ što je gotovo 1,5 puta više nego u eksperimentu broj 2 ($t = 15$ min, $T = 40$ °C, $rpm = 500$ min⁻¹ i $d = 300$ μm) $UF = 126,997 \pm 6,277 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ koji se razlikuju samo u temperaturi ekstrakcije. Kod određivanja antioksidacijskih aktivnosti pripremljenih ekstrakata prema FRAP i DPPH metodi uočeno je da najviša izmjerena vrijednost antioksidacijske aktivnosti dobivena za vodeni ekstrakt pripremljen prema procesnim uvjetima eksperimenta broj 4, $\text{FRAP} = 1,141 \pm 0,010 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$, $\text{DPPH} = 0,502 \pm 0,014 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ dok je ABTS metoda odstupala.

Al-Marazeeq i suradnici (2016) proveli su istraživanje o utjecaju vrste otapala i uvjeta ekstrakcije na udio ukupnih polifenola u ekstraktu lista masline. Polifenoli su ekstrahirani pomoću četiri vrste otapala (80 % metanol, 80 % etanol, aceton i destilirana voda). Ukupni polifenoli bili su u rasponu od $UF = 158-392 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Najveća vrijednost ekstrakcije dobivena je s 80 % metanola i najniža je dobivena destiliranom vodom. Voda je ekstrahirala manje polifenolnih spojeva u usporedbi s drugim otapalima, metanol je poznat kao toksičan za čovjeka stoga njegov ekstrakt nije prihvatljiv za uporabu u hrani iako ima sposobnost ekstrakcije visokog sadržaja polifenolnih spojeva.

Budući da je provedbom pokusa prikupljen veliki broj eksperimentalnih rezultata, kako bi se dobio detaljniji uvid u vezu između podataka provedena je analiza korelacije matrice ulaznih i izlaznih veličina. U tablici 4 dane su vrijednosti koeficijenta korelacije između vremena ekstrakcije, temperature ekstrakcije, promjer čestica, brzina miješanja, ukupne otopljene suhe, vodljivosti, udjela suhe tvari, koncentracije ukupnih fenola, antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom, antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom te antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom. Na temelju dobivenih rezultata može se uočiti da postoji pozitivna korelacija između temperature i svih fizikalnih svojstava (TDS, vodljivost i udio suhe tvari) te da je temperatura negativno korelirala sa svim kemijskim svojstvima (UF, ABTS, DPPH, FRAP). Može se uočiti da su na isti način korelirali vrijeme ekstrakcije, brzina miješanja te promjer čestica. Analizom rezultata u tablici 4 vidimo da je ukupna količina otopljenih tvari i vodljivost pozitivno korelirana s ukupnim polifenolima, antioksidacijskom aktivnosti određenom FRAP i DPPH metodom dok je antioksidacijska aktivnost određena ABTS metodom negativno korelirala. Također, ukupna količina otopljenih tvari i vodljivost pozitivno je korelirala s temperaturom ekstrakcije, vremenom ekstrakcije, brzinom miješanja te udjelom suhe tvari, dok je negativno korelirala s promjerom čestica. Koncentracija ukupnih polifenola pozitivno je korelirala s antioksidacijskim aktivnostima izmjerenim DPPH i FRAP metodom, vremenom ekstrakcije, brzinom miješanja, promjerom čestica te vodljivosti i ukupnom količinom otopljenih tvari, dok je negativno korelirala s antioksidacijskom aktivnošću izmjerenom ABTS metodom i temperaturom. Antioksidacijska aktivnost izmjena ABTS metodom negativno je korelirala sa svim parametrima osim s antioksidacijskom aktivnošću izmjerenom DPPH metodom i promjerom čestica. Iz tablice 4 možemo uočiti da je antioksidacijska aktivnost određena DPPH metoda pozitivno korelirala sa ukupnim polifenolima, antioksidacijskom aktivnošću izmjerenom FRAP metodom, antioksidacijskom aktivnošću izmjerenom ABTS metodom, vodljivosti, ukupnom količinom

otopljenih tvari, vremenom ekstrakcije, te da je negativno korelirala s temperaturom, promjerom čestica, brzinom miješanja te udjelom suhe tvari. Antioksidacijska aktivnost izmjerenom FRAP metodom je pozitivno korelirala s ukupnim polifenolima, antioksidacijskom aktivnošću izmjerenom DPPH metodom, vremenom ekstrakcije, promjerom čestica, brzinom miješanja, ukupnom količinom otopljenih tvari, vodljivosti te udjelom suhe tvari, dok je negativno korelirala s antioksidacijskom aktivnošću izmjerenom ABTS metodom i temperaturom ekstrakcije. U tablici 4 svi statistički značajni koeficijenti korelacije obilježeni su crveno, a oni koji nisu značajni otisnuti su crnom bojom. Istraživanje koje su proveli Mujić i suradnici (2011) pokazalo je da je antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom u čvrstoj korelaciji sa ukupnim polifenolima. Dobiveni rezultati ukazuju na visoku mogućnost primjene lista masline te da se mogu koristiti kao aditivi za hranu i funkcionalnu hranu.

Kako bi se ispitao utjecaj ulaznih varijabli na izlazne varijable u procesu klasične ekstrakcije primijenjena je multivarijatna analiza varijance (MANOVA). Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5. MANOVA je složena analiza varijance koja se koristi kada se želi ispitati utjecaj i interakcija većeg broja nezavisnih varijabli na veći broj zavisnih varijabli. MANOVA omogućuje dobivanje informacija o tome dali se neka zavisna varijabla značajno mijenja pod utjecajem nezavisnih varijabli. Također daje uvid u interakcije između zavisnih i nezavisnih varijabli. MANOVA modelom analize varijance testira se značajnost razlika između vektora koji predstavljaju aritmetičke sredine zavisnih varijabli. Analizom rezultata prikazanih u tablici 5 može se uočiti da na količinu ukupnih ekstrahiranih polifenola najviše utječe promjena vremena ekstrakcije, dok ostali parametri nemaju značajan utjecaj. Zanimljivo je također da ni jedna od ispitivanih ulaznih varijabli (temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, veličina čestica i vrijeme ekstrakcije) nemaju utjecaja na postotak ekstrahirane suhe tvari. Uočen je također minimalna utjecaj ispitivanih ulaznih varijabli na antioksidacijsku aktivnost pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline određenih ABTS, DPPH i FRAP metodom te na ukupnu količinu otopljenih tvari i vodljivost.

Kako bi se dobio uvid u grupiranje i kako bi se identificirali potencijalni podaci koji odstupaju primijenjena je analiza osnovnih komponenata (PCA). Analiza osnovnih komponenata primjenjuje mali broj nezavisnih linearnih kombinacija promatranog seta varijabli kako bi ostalo sačuvano čim više informacija (Bursać Kovačević i sur., 2016). Uzorci vodenih ekstrakata lista masline grupirani su primjenom PCA analize pri čemu je svaka komponenata modela opisana s dvije karakteristike (opterećenja i rezultati (eng. *scores*)). Opterećenja

opisuju strukturu podataka vezano na korelacije između varijabli, dok rezultati opisuju razlike ili sličnosti između podataka. Rezultati analize osnovnih komponenta uzoraka vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije koja je obuhvatila temperaturu ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, promjer čestica, brzinu miješanja, ukupne ekstrahirane polifenole, antioksidacijsku aktivnost izmjerenu ABTS, DPPH i FRAP metodom, ukupne otopljene tvari, vodljivost te udio ekstrahirane suhe tvari prikazani su na slici 7. Iz rezultata se može vidjeti da prva dva faktora opisuju 51,55 % varijance. Može se također uočiti da su se uzorci vodenih ekstrakata na temelju fizikalnih i kemijskih svojstava rasporedili u sva četiri kvadranta bez značajnog profila. PCA analiza daje također uvid u korelacije između fizikalnih i kemijskih svojstava pripremljenih vodenih ekstrakata na zoran način.

Tablica 3. Fizikalne i kemijske karakteristike pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline postupkom klasične ekstrakcije (rezultati su prikazani u obliku: srednja vrijednost \pm standardna devijacija)

Eksp.	t / min	T / °C	rpm / min^{-1}	d / μm	pH	TDS / $mg\ L^{-1}$	G / $\mu S\ cm^{-1}$	%suhe tvari	UF / $mg_{GAE}\ g_{s.t.}^{-1}$	ABTS / $mmol_{Trolox}\ g_{s.t.}^{-1}$	DPPH / $mmol_{Trolox}\ g_{s.t.}^{-1}$	FRAP / $mmol_{FeSO_4 \cdot 7H_2O}\ g_{s.t.}^{-1}$
1	5	40	500	300	5,58 \pm 0,01	320 \pm 9,00	639,5 \pm 20,506	0,4886	150,812 \pm 7,417	0,464 \pm 0,059	0,422 \pm 0,856	0,927 \pm 0,005
2	15	40	500	300	5,47 \pm 0,01	375,5 \pm 0,707	756 \pm 4,243	0,5069	126,997 \pm 6,277	0,390 \pm 0,039	0,378 \pm 0,002	0,773 \pm 0,004
3	5	80	500	300	5,40 \pm 0,02	374,5 \pm 16,263	760,5 \pm 16,263	0,5734	160,980 \pm 15,876	0,452 \pm 0,043	0,386 \pm 0,009	1,015 \pm 0,041
4	15	80	500	300	5,38 \pm 0,03	430,5 \pm 2,121	861 \pm 1,414	0,5405	194,272 \pm 3,271	0,442 \pm 0,012	0,502 \pm 0,014	1,141 \pm 0,010
5	10	60	250	100	5,46 \pm 0,00	387,5 \pm 0,707	776,5 \pm 2,121	0,5516	145,489 \pm 10,256	0,470 \pm 0,104	0,367 \pm 0,002	0,898 \pm 0,076
6	10	60	750	100	5,47 \pm 0,01	382 \pm 7,071	766 \pm 11,314	0,5430	152,053 \pm 4,069	0,471 \pm 0,023	0,383 \pm 0,026	0,929 \pm 0,041
7	10	60	250	500	5,46 \pm 0,03	389 \pm 1,414	778,5 \pm 2,121	0,5209	151,431 \pm 1,358	0,481 \pm 0,048	0,347 \pm 0,017	0,897 \pm 0,004
8	10	60	750	500	5,36 \pm 0,01	403 \pm 15,556	810 \pm 29,698	0,6144	152,191 \pm 5,755	0,412 \pm 0,038	0,303 \pm 0,097	0,908 \pm 0,288
9	10	60	500	300	5,45 \pm 0,03	395 \pm 1,414	789 \pm 4,243	0,5422	142,116 \pm 2,119	0,441 \pm 0,002	0,382 \pm 0,009	1,025 \pm 0,133
10	5	60	500	100	5,48 \pm 0,04	391,5 \pm 2,121	782 \pm 2,828	0,5612	153,458 \pm 4,095	0,445 \pm 0,024	0,3990 \pm 0,038	0,797 \pm 0,105
11	15	60	500	100	5,45 \pm 0,01	407 \pm 9,899	809 \pm 25,456	0,5953	134,918 \pm 1,930	0,453 \pm 0,084	0,352 \pm 0,002	0,810 \pm 0,099
12	5	60	500	500	5,41 \pm 0,01	358 \pm 4,243	712,5 \pm 4,950	0,4906	154,137 \pm 4,095	0,571 \pm 0,061	0,429 \pm 0,031	0,818 \pm 0,117
13	15	60	500	500	5,45 \pm 0,01	377,5 \pm 37,477	753,5 \pm 75,660	0,5771	133,099 \pm 4,748	0,460 \pm 0,067	0,332 \pm 0,019	0,778 \pm 0,006
14	10	40	250	300	5,43 \pm 0,00	341 \pm 4,243	687,5 \pm 4,950	0,5254	139,406 \pm 13,121	0,507 \pm 0,085	0,397 \pm 0,048	0,874 \pm 0,063
15	10	80	250	300	5,41 \pm 0,01	405 \pm 7,071	811,5 \pm 10,604	0,5907	166,428 \pm 1,047	0,391 \pm 0,067	0,419 \pm 0,015	0,791 \pm 0,150
16	10	40	750	300	5,48 \pm 0,04	395 \pm 0	790 \pm 0	0,5322	150,795 \pm 0,332	0,439 \pm 0,012	0,369 \pm 0,024	0,845 \pm 0,100
17	10	80	750	300	5,46 \pm 0,01	388,5 \pm 3,536	775 \pm 7,485	0,5730	160,221 \pm 1,388	0,495 \pm 0,126	0,433 \pm 0,039	1,027 \pm 0,017
18	10	60	500	300	5,42 \pm 0,01	422,5 \pm 6,364	843,5 \pm 13,435	0,6476	146,213 \pm 14,331	0,353 \pm 0,009	0,376 \pm 0,029	0,973 \pm 0,003
19	5	60	250	300	5,40 \pm 0,01	385,5 \pm 3,536	771 \pm 7,071	0,5572	155,354 \pm 3,014	0,423 \pm 0,016	0,495 \pm 0,007	0,994 \pm 0,074
20	15	60	250	300	5,41 \pm 0,03	394,5 \pm 0,707	790 \pm 1,414	0,5919	145,618 \pm 7,616	0,449 \pm 0,086	0,422 \pm 0,004	1,073 \pm 0,045
21	5	60	750	300	5,48 \pm 0,01	382,5 \pm 7,778	767 \pm 11,314	0,5568	153,217 \pm 6,191	0,389 \pm 0,040	0,423 \pm 0,005	1,057 \pm 0,002
22	15	60	750	300	5,46 \pm 0,00	387,5 \pm 0,707	774,5 \pm 0,707	0,5780	147,826 \pm 1,988	0,414 \pm 0,037	0,423 \pm 0,004	0,932 \pm 0,033
23	10	40	500	100	5,43 \pm 0,00	387 \pm 2,828	772 \pm 2,828	0,5682	136,277 \pm 2,955	0,439 \pm 0,019	0,426 \pm 0,002	0,953 \pm 0,002
24	10	80	500	100	5,45 \pm 0,02	418,5 \pm 7,778	834,5 \pm 19,092	0,6455	152,397 \pm 4,108	0,447 \pm 0,102	0,411 \pm 0,022	1,020 \pm 0,106
25	10	40	500	500	5,42 \pm 0,01	377,5 \pm 6,364	756 \pm 12,728	0,5162	148,795 \pm 8,389	0,469 \pm 0,012	0,389 \pm 0,017	1,112 \pm 0,086
26	10	80	500	500	5,43 \pm 0,04	394 \pm 5,657	772,5 \pm 34,648	0,5770	162,708 \pm 3,064	0,370 \pm 0,026	0,380 \pm 0,013	1,017 \pm 0,044
27	10	60	500	300	5,41 \pm 0,03	393 \pm 2,828	767,5 \pm 27,577	0,6063	168,035 \pm 3,121	0,307 \pm 0,047	0,392 \pm 0,038	1,207 \pm 0,095

Tablica 4. Pearson-ova korelacijska matrica ulaznih i izlaznih veličina procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom klasične ekstrakcije

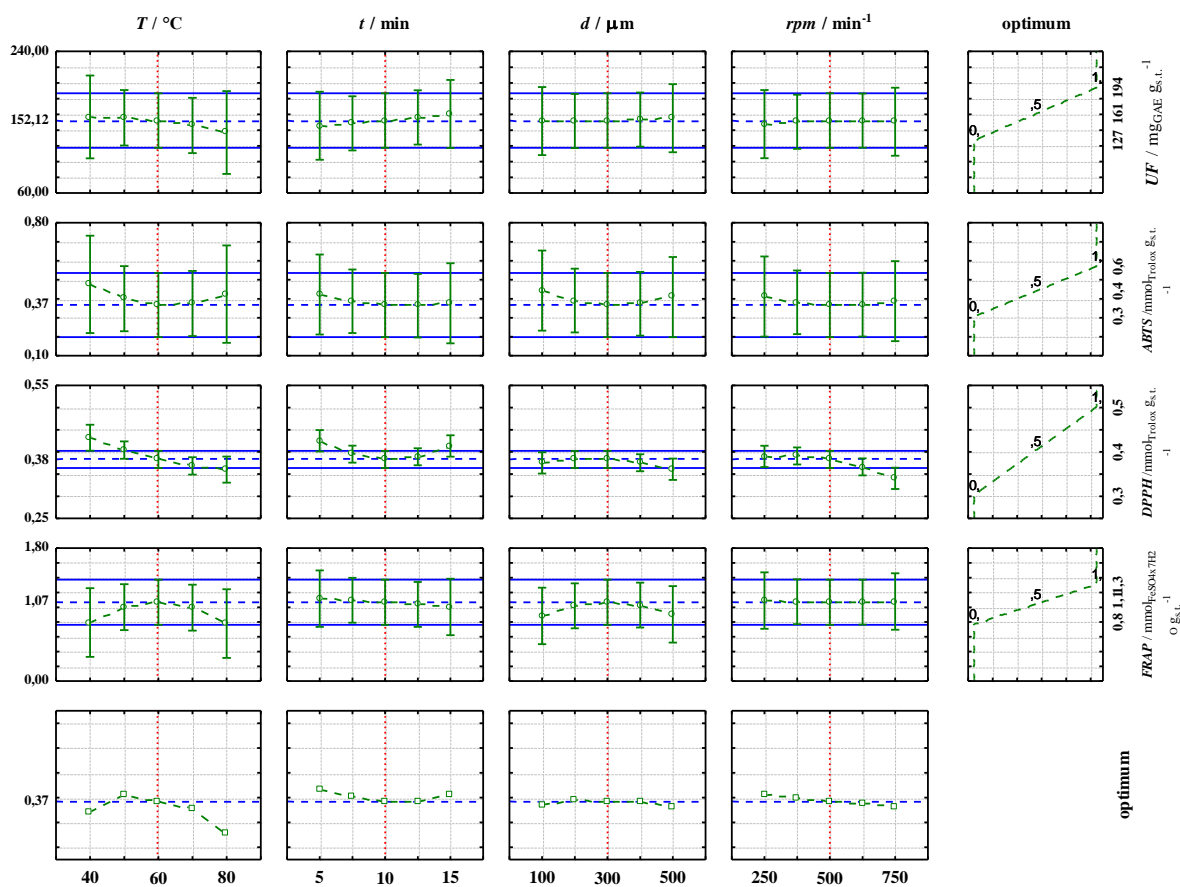
	<i>T</i>	<i>t</i>	<i>d</i>	<i>rpm</i>	<i>UF</i>	<i>ABTS</i>	<i>DPPH</i>	<i>FRAP</i>	<i>TDS</i>	<i>G</i>	<i>%s.tv.</i>
<i>T</i>	1	0,000	0,000	0,000	-0,196	-0,150	-0,190	-0,044	0,401	0,396	0,223
<i>t</i>	0,000	1	0,000	0,000	0,623	-0,122	0,199	0,140	0,537	0,526	0,501
<i>d</i>	0,000	0,000	1	0,000	0,054	-0,108	-0,150	0,073	0,090	0,086	0,082
<i>rpm</i>	0,000	0,000	0,000	1	0,120	0,043	-0,206	0,138	-0,186	-0,199	-0,233
<i>UF</i>	-0,196	0,623	0,054	0,120	1	-0,156	0,506	0,454	0,337	0,315	0,081
<i>ABTS</i>	-0,150	-0,122	-0,108	0,043	-0,156	1	0,073	-0,246	-0,435	-0,392	-0,541
<i>DPPH</i>	-0,189	0,199	-0,150	-0,206	0,506	0,073	1	0,332	0,007	0,004	-0,176
<i>FRAP</i>	-0,044	0,140	0,073	0,138	0,454	-0,246	0,332	1	0,188	0,159	0,129
<i>TDS</i>	0,401	0,537	0,090	-0,186	0,337	-0,436	0,007	0,188	1	0,992	0,681
<i>G</i>	0,396	0,526	0,086	-0,200	0,315	-0,392	0,004	0,159	0,992	1	0,662
<i>%s.tv.</i>	0,223	0,501	0,082	-0,233	0,081	-0,541	-0,176	0,129	0,681	0,662	1

Tablica 5. Multivarijatna analiza varijance (MANOVA) provedena na podacima UF, ABTS, DPPH, FRAP, TDS, G, postotak suhe tvari za postupak klasične ekstrakcije

Varijacije parametara		<i>UF</i>	<i>ABTS</i>	<i>DPPH</i>	<i>FRAP</i>	<i>TDS</i>	<i>G</i>	<i>%s.tv.</i>
<i>T</i>	40	154,66 ^a	0,46 ^a	0,43 ^a	0,93 ^a	368,67 ^a	738,75 ^a	0,54 ^a
	60	142,16 ^b	0,41 ^a	0,36 ^b	0,92 ^a	367,41 ^a	733,13 ^a	0,53 ^a
	80	147,12 ^a	0,43 ^a	0,40 ^a	0,92 ^a	395,42 ^b	790,67 ^b	0,56 ^a
<i>t</i>	5	142,18 ^b	0,45 ^a	0,40 ^a	0,95 ^a	366,00 ^a	733,50 ^a	0,52 ^a
	10	149,01 ^a	0,44 ^a	0,39 ^a	0,94 ^a	390,40 ^a	779,37 ^b	0,57 ^a
	15	166,17 ^c	0,43 ^a	0,42 ^a	1,00 ^b	401,83 ^b	802,50 ^b	0,58 ^a
<i>d</i>	100	150,62 ^a	0,45 ^a	0,41 ^a	0,92 ^a	383,75 ^a	769,17 ^a	0,56 ^a
	300	151,01 ^a	0,43 ^a	0,40 ^a	0,97 ^a	388,13 ^a	773,93 ^b	0,56 ^a
	500	152,72 ^a	0,44 ^a	0,39 ^a	0,95 ^a	389,75 ^a	780,42 ^b	0,57 ^a
<i>rpm</i>	250	145,77 ^a	0,45 ^a	0,39 ^a	0,90 ^b	395,58 ^b	790,00 ^b	0,58 ^a
	500	153,89 ^a	0,42 ^a	0,41 ^a	0,98 ^a	386,03 ^a	772,23 ^a	0,56 ^a
	750	150,39 ^a	0,46 ^a	0,36 ^b	0,95 ^a	383,17 ^a	763,83 ^a	0,55 ^a

*različita slova u istom stupcu upućuju na značajno različitu vrijednost promatranog parametra ovisno o promatranim promjenama parametara (*T*, *t*, *d*, *rpm*)

4.1.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom klasične ekstrakcije



Slika 8. Optimalni uvjeti za ekstrakciju biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom klasične ekstrakcije

U svrhu definiranja optimalnih procesnih uvjeta za provođenje ekstrakcije biološki aktivnih komponenata lista masline postupkom klasične ekstrakcije primijenjena je metoda odzivnih površina. Analiziran je utjecaj četiri varijable (temperatura, vrijeme, veličina čestica i brzina miješanja) na tri razine (temperatura ekstrakcije $T = 40, 60$ i $80\text{ }^\circ\text{C}$, vrijeme ekstrakcije $t = 5, 10$ i 15 , veličina čestica $d = 100, 300$ i 500 te brzina miješanja $\text{rpm} = 250, 500$ i 750 min^{-1}) na koncentraciju ukupnih polifenola te antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS, DPPH i FRAP metodom simultano. Metoda se bazira na definiranju minimuma odzivne površine koji predstavlja optimalne procesne uvjete. Na slici 8 prikazani su dvodimenzionalni prikazi zavisnosti izlaznih varijabli i procesnim uvjetima te procijenjeni optimalni procesni uvjeti. Iz rezultata se može uočiti da se u pripremljenim vodenim ekstraktima lista masline prema planu pokusa udio ukupnih polifenola nalazi se u intervalu od $UF = 60\text{ mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $UF = 240\text{ mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ dok prema modelu optimalni udio ukupnih polifenola iznosi $UF = 152,12\text{ mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Iz slike 8 uočava se da povećanje temperature ekstrakcije, promjer čestica i brzina miješanja ne

utječu na udio ukupnih polifenola, dok se udio ukupnih polifenola povećava sa povećanjem vremena ekstrakcije. Također, možemo vidjeti da se antioksidacijska aktivnost mjerena ABTS metodom nalazi u intervalu od $ABTS = 0,10 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $ABTS = 0,80 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ te da je optimalna vrijednost $ABTS = 0,37 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Vidljivo je također da je minimum odzivne funkcije pri $T = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Što se tiče vremena ekstrakcije možemo uočiti da povećanje vremena ekstrakcije znatno ne utječe na antioksidaciju aktivnost mjerenu ABTS metodom, isto tako možemo reći i za promjer čestica i brzinu miješanja. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom nalazi se u intervalu od $DPPH = 0,25 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $DPPH = 0,55 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ dok je optimalna vrijednost $DPPH = 0,38 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Možemo uočiti da povećanje temperature i brzine miješanja dovodi do smanjenja dok promjer čestica ne utječe antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom. Optimalna antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom iznosi $FRAP = 1,07 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$, možemo uočiti da pri $T = 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ i $T = 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti dok vrijeme ekstrakcije i brzina miješanja ne utječu na antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom. Iz slike 8 možemo vidjeti da su izračunati optimalni uvjeti klasične ekstrakcije ukupnih polifenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom, FRAP metodom, DPPH metodom temperatura $T = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, vrijeme ekstrakcije $t = 10 \text{ min}$, promjer čestica $d = 300 \mu\text{m}$ te brzina miješanja $\text{rpm} = 500 \text{ min}^{-1}$.

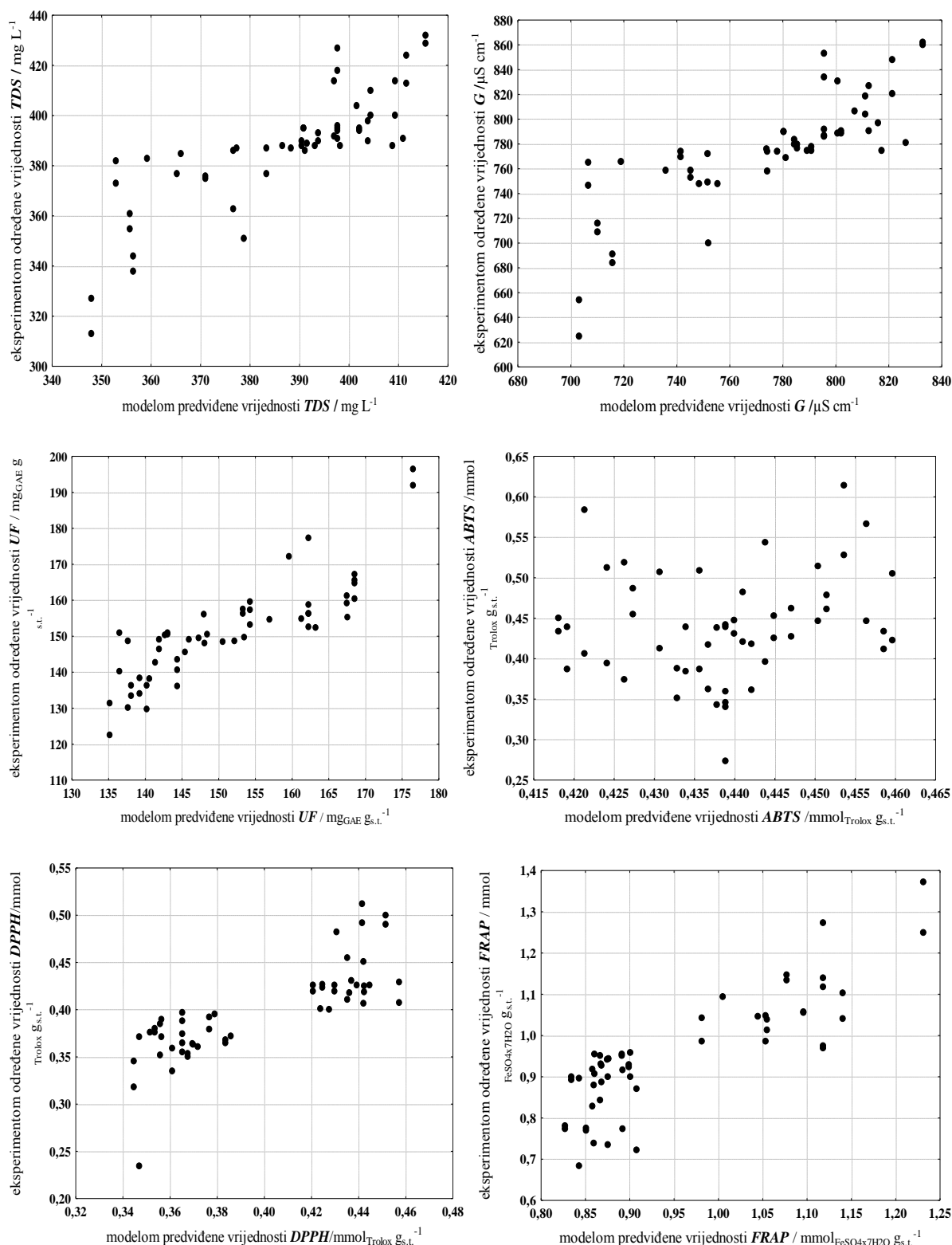
4.1.3. Modeli lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije

U okviru ovog rada upotrebljena je metoda lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije na temelju ulaznih varijabli (temperatura ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, veličina čestica te brzina miješanja). Metoda lokalne linearne regresije ili metoda segmentirane regresije bazira se na dijeljenju zavisne varijable na intervale i procjeni linearnog modela za svaki od segmenata. Granice između segmenta nazivaju se točke prijeloma. U tablici 6 dani su procijenjeni parametri modela linearne regresija za fizikalna i kemijska svojstva vodenih ekstrakata lista masline dok je na slici 9 dana usporedba eksperimentalnih vrijednosti i modela lokalne linearne regresije. Parametar B_0 predstavlja točku prijeloma pojedinog modela, parametar B_1 dolazi uz temperaturu ekstrakcije, parametra B_2 uz vrijeme ekstrakcije, parametar B_3 uz promjer čestica te parametra B_4 uz brzinu miješanja. Analizom rezultat procijenjenih vrijednosti parametra može se uočiti da s

u procijenjene vrijednosti pouzdane budući da su izračunate standarde pogreške za minimalno jedan red veličine manje od procijenjene vrijednosti parametara. Na temelju toga može se zaključiti da se razvijeni modeli mogu pouzdano koristiti za predikciju fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline za analizirani raspon ulaznih varijabli. Slika 9 jasno pokazuje trend ovisnosti ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnost, kako se mijenja udio ukupnih polifenola tako se mijenja i antioksidacijska aktivnost. Također se jasno vidi da DPPH metoda i FRAP metoda pokazuju sličan trend dok se kod ABTS metode jasno vidi da je raspršenje jako široko da nije unutar intervala pouzdanosti. Na temelju koeficijenta determinacije može se zaključiti da razvijeni model nije pouzdan za predviđanje antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom ($R^2 = 0,175$). Numerički gledano viša vrijednost koeficijenta determinacije dobivena je ($R^2 = 0,835$) kod FRAP metode, ($R^2 = 0,799$) kod DPPH metode, ($R^2 = 0,821$) kod TDS-a te ($R^2 = 0,816$) za vodljivost.

Tablica 6. Parametri modela lokalne linearne regresije za predviđanje ukupnih otopljenih tvari, vodljivosti, koncentracije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti (određenih ABTS, DPPH i FRAP metodama) vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije

zavisna varijabla	B_0	B_1	B_2	B_3	B_4	R^2
<i>TDS</i>	319,151 ± 20,945	0,575 ± 0,039	2,863 ± 0,201	0,015 ± 0,001	-0,026 ± 0,015	0,821
<i>G</i>	658,865 ± 70,324	1,050 ± 0,073	4,857 ± 0,406	0,043 ± 0,038	-0,069 ± 0,011	0,816
<i>UF</i>	145,537 ± 25,164	-0,257 ± 0,042	0,799 ± 0,157	0,014 ± 0,003	0,004 ± 0,002	0,842
<i>ABTS</i>	0,099 ± 0,045	-0,030 ± 0,005	0,096 ± 0,002	-1,639 ± 0,018	1,132 ± 0,013	0,175
<i>DPPH</i>	0,421 ± 0,044	-0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,002	-0,004 ± 0,001	-0,004 ± 0,005	0,799
<i>FRAP</i>	0,962 ± 0,106	-0,001 ± 0,001	-0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,002	-0,001 ± 0,001	0,835



Slika 9. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti i modela lokalne linearne regresije vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije za (a) TDS, (b) vodljivost, (c) UF, (d) ABTS, (e) DPPH i (f) FRAP.

4.2. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

U novije vrijeme razvijena je brza i pouzdana analitička metoda ekstrakcije koja koristi mikrovalove (ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima). Mikrovalna ekstrakcija se često primjenjuje za analizu tragova organskih spojeva kod krutih uzoraka. Također se primjenjuje za ekstrakciju prirodnih spojeva kao što su flavanoidi i kofein te polifenolnih spojeva iz čaja i sjemenki grožđa. Mikrovalnom ekstrakcijom ili ekstrakcijom u kombinaciji ultrazvuka i mikrovalova, moguće je dobiti slične udjele ekstrahiranih tvari kao i standardnim metodama, ali uz puno kraće vrijeme što je energetski i ekonomski isplativo (Abert, 2008).

4.2.1. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata iz lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

U okviru ovog rada povedena je ekstrakcija biološki aktivnih komponenti iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Isto kao i kod klasične ekstrakcije napravljen je plan eksperimenata primjenom metodologije odzivne površine (RSM). Analiziran je utjecaj četiri varijable (temperature, vremena ekstrakcije, promjera čestica i snaga mikrovalova) na tri nivoa. Eksperimentalno određene vrijednosti fizikalnih svojstava (pH, TDS, vodljivost i udio suhe tvari) te kemijska svojstva (ukupni polifenoli i antioksidacijska aktivnost određena ABTS, DPPH i FRAP metodom) u 27 provedenih eksperimenata prikazani su u tablici 7. Analizom rezultata prikazanih u tablici 7 možemo uočiti da su pH vrijednosti svih vodenih ekstrakata pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima približno jednake te da nema značajne razlike u odnosu na pH vrijednosti ekstrakata pripremljenih postupkom klasične ekstrakcije. Analizom rezultata možemo također uočiti da je ukupna otopljena tvar najniža u ekstraktu pripremljenom prema procesnim uvjetima eksperimenta 14 ($P = 600 \text{ W}$, $t = 5 \text{ min}$, $d = 100 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$), dok je najviša u ekstraktu pripremljenom prema procesnim uvjetima eksperimenta 26 ($P = 600 \text{ W}$, $t = 15 \text{ min}$, $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Također, najniža vodljivosti izmjerena najviša u ekstraktu pripremljenom prema procesnim uvjetima eksperimenta 13 ($P = 800 \text{ W}$, $t = 10 \text{ min}$, $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 80^{\circ}\text{C}$) dok je najviša izmjerena u najviša u ekstraktu pripremljenom prema procesnim uvjetima eksperimenta 25 ($P = 600 \text{ W}$, $t = 5 \text{ min}$, $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Važno je napomenuti da se analiza ukupnih otopljenih tvari i vodljivosti tek od nedavno primjenjuje u analizi učinkovitosti ekstrakcijskih procesa. Električna vodljivost predstavlja mjeru koliko

lako može električna struja prolaziti kroz vodu ili neku drugu otopinu ili suspenziju, a na električnu vodljivost značajno utječu prisutnost slabih elektrolita, pH i temperatura.

Analiza rezultata kemijskih analiza pokazala je da je najveća količina ukupnih polifenola ekstrahirana u ekstraktu pripremljenom prema procesnim uvjetima eksperimenta 26 ($P = 600\text{ W}$, $t = 15\text{ min}$, $d = 300\text{ }\mu\text{m}$, $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) $UF = 157,523 \pm 2,336\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ što je gotovo 1,7 puta više nego u ekstraktu pripremljenom prema procesnim uvjetima eksperimenta 3 ($P = 400\text{ W}$, $t = 15\text{ min}$, $d = 300\text{ }\mu\text{m}$, $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) $UF = 90,209 \pm 10,542\text{ mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Eksperiment 26 i 3 razlikuju se u snazi mikrovalova i temperaturi ekstrakcije dok su vrijeme ekstrakcije i promjer čestica jednaki na temelju čega bi se moglo zaključiti da veća snaga mikrovalova i viša temperatura imaju pozitivan utjecaj na količinu ekstrahiranih ukupnih polifenola. Najviša vrijednost antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom određena je u ekstraktu pripremljenom prema procesnim uvjetima eksperimenta 10 ($P = 400\text{ W}$, $t = 10\text{ min}$, $d = 300\text{ }\mu\text{m}$, $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) $ABTS = 0,873 \pm 0,011\text{ mmol}_{\text{Trolox}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$, dok je najniža vrijednost izmjerena u ekstraktu pripremljenom prema procesnim uvjetima eksperimenta 15 ($P = 600\text{ W}$, $t = 15\text{ min}$, $d = 100\text{ }\mu\text{m}$, $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) $ABTS = 0,497 \pm 0,012\text{ mmol}_{\text{Trolox}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Najviša antioksidacijska vrijednost mjerena DPPH metodom izmjerena je u ekstraktu pripremljenom prema procesnim uvjetima eksperimenta 8 ($P = 600\text{ W}$, $t = 10\text{ min}$, $d = 500\text{ }\mu\text{m}$, $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dok je najviša antioksidacijska vrijednost mjerena FRAP metodom u ekstraktu pripremljenom prema procesnim uvjetima eksperimenta 25 ($P = 600\text{ W}$, $t = 5\text{ min}$, $d = 300\text{ }\mu\text{m}$, $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) iznosila $1,569 \pm 0,572\text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ dok je najniža vrijednost gotovo 2,5 puta manja. Iz dobivenih rezultata mjerenja možemo uočiti da se ovisno o metodi mjerenja razlikuju antioksidacijske aktivnosti ekstrakata lista masline.

Kako bi se ispitala povezanost fizikalnih karakteristika i kemijskih svojstava pripremljenih vodenih ekstrakata u okviru ovog rad određena je korelacijska matrica između nabrojanih svojstava. Metoda je korištena za prikaz sličnosti i različitosti uzoraka, ovisno o mjerenim parametrima. U tablici 8 prikazane su vrijednosti koeficijenta korelacije između snage mikrovalova, temperature, promjera čestice, vremena ekstrakcije, TDS, vodljivosti, postotak ekstrahirane suhe tvari, koncentracije ukupnih fenola, antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom, antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom, antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom. Zanimljivo je uočiti da su ukupni polifenoli pozitivno korelirali s vodljivosti i ukupnom otopljenom suhom tvari dok su antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom, FRAP metodom i DPPH metodom negativno korelirale. Ukupni polifenoli i antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom pozitivno korelirala sa

snagom mikrovalova, dok su antioksidacijska aktivnost mjerena ABTS i FRAP metodom negativno korelirala sa snagom mikrovalova. Ukupni polifenoli pozitivno su korelirali sa svim fizikalnim i kemijskim karakteristikama osim antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom. Antioksidacijske aktivnost mjerena ABTS metodom pozitivno je korelirala s antioksidacijskom aktivnosti mjerenom FRAP metodom dok je sa druge dvije metode antioksidacijske aktivnosti i fizikalnim karakteristikama korelirala negativno. Postotak ekstrahirane suhe tvari pozitivno je koreliran s ukupnim polifenolima, antioksidacijskom aktivnosti mjerenom DPPH metodom te fizikalnim karakteristikama dok je negativno korelirala s antioksidacijskom aktivnosti mjerenom ABTS i FRAP metodom. U tablici 8 svi statistički značajni koeficijenti korelacije obilježeni su crveno, a oni koji nisu značajni otisnuti su crnom bojom.

Kako bi se ispitao utjecaj ulaznih varijabli na izlazne varijable u procesu ekstrakcije potpomognute mikrovalovima primijenjena je multivarijatna analiza varijance (MANOVA). Analizom rezultata prikazanih u tablici 9 može se uočiti da na količinu ukupnih ekstrahiranih polifenola imaju utjecaj sve četiri ispitivane varijable. Na količinu ukupnih ekstrahiranih polifenola najviše utječe najviša korištena snaga mikrovalova, najduže vrijeme ekstrakcije, najmanji korišteni promjer čestica te najviša temperatura. Na antioksidacijsku aktivnost pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline određenih ABTS metodom značajni utjecaj ima samo najniža korištena temperatura ekstrakcije, dok na antioksidacijsku aktivnost pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline određenih FRAP metodom značajan utjecaj ima samo najkraće vrijeme ekstrakcije. Zanimljivo je također da ni jedna od ispitivanih ulaznih varijabli nema utjecaja na antioksidacijsku aktivnost pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline određenih DPPH metodom. Što se pak fizikalnih svojstava pripremljenih vodenih ekstrakata tiče, na ukupnu količinu otopljenih tvari značajan utjecaj ima vrijeme provedbe ekstrakcije, na postotak ekstrahirane suhe tvari vrijeme ekstrakcije i temperatura ekstrakcije, dok rezultati pokazuju da na vodljivost pripremljenih ekstrakata utječe snaga korištenih mikrovalova, promjer čestica te temperatura ekstrakcije.

Analiza osnovnih komponenata (PCA) upotrijebljena je kako bi se analiziralo grupiranje vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na temelju njihovih fizikalnih i kemijskih svojstava. Rezultati analize osnovnih komponenata uzoraka vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima koja je obuhvatila snagu mikrovalova, temperaturu ekstrakcije, vrijeme ekstrakcije, promjer čestica, ukupne ekstrahirane polifenole,

antioksidacijsku aktivnost izmjerenu ABTS, DPPH i FRAP metodom, ukupne otopljene tvari, vodljivost te udio ekstrahirane suhe tvari prikazani su na slici 10. Iz rezultata se može vidjeti da prva dva faktora opisuju 49,72 % varijance. Može se također uočiti da su se uzorci vodenih ekstrakata na temelju fizikalnih i kemijskih svojstava rasporedili u sva četiri kvadranta bez značajnog profila uz odstupanje vodenog ekstrakta pripremljen prema procesnim uvjetima eksperimenta 26 ($P = 600 \text{ W}$, $t = 15 \text{ min}$, $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Uzorci grupirani u trećem kvadrantu imali su najvišu vrijednost antioksidacijske aktivnosti izmjerene ABTS metodom. Rezultati PCA analiza mogu se jednostavno povezati s koeficijentima korelacije.

Tablica 7. Fizikalne i kemijske karakteristike pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (rezultati su prikazani u obliku: srednja vrijednost \pm standardna devijacija)

Eksp.	<i>P</i> / W	<i>t</i> / min	<i>d</i> / μm	<i>T</i> / $^{\circ}\text{C}$	<i>pH</i>	<i>TDS</i> / mg L^{-1}	<i>G</i> / $\mu\text{S cm}^{-1}$	%s.tv.	<i>UF</i> / $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{s.t.}}^{-1}$	<i>ABTS</i> / $\text{mmol}_{\text{Trolox}} \text{g}_{\text{s.t.}}^{-1}$	<i>DPPH</i> / $\text{mmol}_{\text{Trolox}} \text{g}_{\text{s.t.}}^{-1}$	<i>FRAP</i> / $\text{mmol}_{\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}} \text{g}_{\text{s.t.}}^{-1}$
1	400	5	300	60	5,43 \pm 0,16	364,5 \pm 4,950	729 \pm 1,414	0,5210	133,279 \pm 3,223	0,503 \pm 0,021	0,389 \pm 0,022	0,829 \pm 0,083
2	800	5	300	60	5,41 \pm 0,18	346,5 \pm 44,548	684 \pm 101,823	0,5077	140,329 \pm 7,659	0,552 \pm 0,044	0,438 \pm 0,017	1,181 \pm 0,517
3	400	15	300	60	5,38 \pm 0,13	342,5 \pm 4,950	683 \pm 11,314	0,5328	90,209 \pm 10,542	0,619 \pm 0,005	0,420 \pm 0,031	0,815 \pm 0,075
4	800	15	300	60	5,37 \pm 0,16	362 \pm 12,728	727 \pm 15,556	0,5280	130,909 \pm 1,674	0,724 \pm 0,005	0,407 \pm 0,022	0,748 \pm 0,088
5	600	10	100	40	5,53 \pm 0,01	389,5 \pm 14,849	779,5 \pm 28,991	0,5131	114,747 \pm 2,412	0,668 \pm 0,012	0,374 \pm 0,017	0,741 \pm 0,071
6	600	10	500	40	5,50 \pm 0,03	353,5 \pm 6,364	700,5 \pm 19,092	0,4813	122,573 \pm 3,673	0,779 \pm 0,067	0,374 \pm 0,032	0,637 \pm 0,002
7	600	10	100	80	5,36 \pm 0,16	388 \pm 4,243	774,5 \pm 13,435	0,5610	147,286 \pm 11,975	0,669 \pm 0,098	0,461 \pm 0,009	0,919 \pm 0,134
8	600	10	500	80	5,34 \pm 0,14	344,5 \pm 13,435	692 \pm 14,142	0,5786	147,023 \pm 2,903	0,577 \pm 0,019	0,486 \pm 0,002	0,990 \pm 0,128
9	600	10	300	60	5,48 \pm 0,01	352 \pm 2,828	702,5 \pm 2,121	0,5109	144,724 \pm 10,899	0,742 \pm 0,078	0,433 \pm 0,005	0,933 \pm 0,226
10	400	10	300	40	5,52 \pm 0,01	362 \pm 21,213	717 \pm 39,598	0,4720	103,274 \pm 1,872	0,873 \pm 0,011	0,442 \pm 0,027	1,358 \pm 0,967
11	800	10	300	40	5,52 \pm 0,02	363 \pm 15,556	734 \pm 25,456	0,4926	134,746 \pm 0,718	0,692 \pm 0,164	0,451 \pm 0,018	0,879 \pm 0,007
12	400	10	300	80	5,31 \pm 0,16	365,5 \pm 24,749	745 \pm 26,870	0,5930	135,748 \pm 9,539	0,499 \pm 0,063	0,458 \pm 0	0,915 \pm 0,037
13	800	10	300	80	5,35 \pm 0,15	350 \pm 29,698	642 \pm 2,828	0,5676	144,695 \pm 10,278	0,510 \pm 0,039	0,469 \pm 0,013	1,005 \pm 0,035
14	600	5	100	60	5,42 \pm 0,16	334 \pm 38,184	730 \pm 8,485	0,5535	126,139 \pm 7,506	0,570 \pm 0,013	0,416 \pm 0,009	1,735 \pm 1,252
15	600	15	100	60	5,34 \pm 0,16	418 \pm 12,728	841 \pm 21,213	0,6421	120,603 \pm 2,890	0,497 \pm 0,012	0,386 \pm 0,008	0,710 \pm 0,110
16	600	5	500	60	5,49 \pm 0,11	352,5 \pm 9,192	701 \pm 36,770	0,4974	125,021 \pm 0,533	0,748 \pm 0,045	0,405 \pm 0,020	1,030 \pm 0,352
17	600	15	500	60	5,38 \pm 0,13	338,5 \pm 7,778	682,5 \pm 81,317	0,5491	120,082 \pm 2,415	0,616 \pm 0,177	0,409 \pm 0,037	0,774 \pm 0,093
18	600	10	300	60	5,48 \pm 0,02	342,5 \pm 10,607	698 \pm 12,728	0,5082	145,619 \pm 6,261	0,803 \pm 0,012	0,467 \pm 0,019	0,945 \pm 0,103
19	400	10	100	60	5,58 \pm 0,01	389,5 \pm 10,607	776,5 \pm 23,334	0,5506	121,011 \pm 9,311	0,722 \pm 0,119	0,394 \pm 0,044	1,049 \pm 0,248
20	800	10	100	60	5,51 \pm 0,01	366 \pm 1,414	714,5 \pm 13,435	0,6034	116,626 \pm 2,051	0,522 \pm 0,150	0,374 \pm 0,006	0,681 \pm 0,092
21	400	10	500	60	5,49 \pm 0,03	390,5 \pm 4,950	782 \pm 12,728	0,5174	137,222 \pm 6,833	0,651 \pm 0,226	0,422 \pm 0,027	0,815 \pm 0,081
22	800	10	500	60	5,53 \pm 0,01	382,5 \pm 26,163	761 \pm 57,983	0,5038	132,621 \pm 12,457	0,764 \pm 0,032	0,446 \pm 0,010	1,139 \pm 0,018
23	600	5	300	40	5,55 \pm 0,00	370,5 \pm 20,506	740,5 \pm 40,305	0,5129	131,107 \pm 0,689	0,595 \pm 0,039	0,398 \pm 0,002	1,066 \pm 0,372
24	600	15	300	40	5,38 \pm 0,16	344 \pm 24,042	685 \pm 65,054	0,5296	121,445 \pm 4,840	0,822 \pm 0,019	0,333 \pm 0,024	0,916 \pm 0,094
25	600	5	300	80	5,33 \pm 0,15	343 \pm 53,740	697 \pm 83,439	0,5797	150,826 \pm 0,152	0,639 \pm 0,062	0,460 \pm 0,007	1,569 \pm 0,572
26	600	15	300	80	5,24 \pm 0,17	495 \pm 1,414	785,5 \pm 3,536	0,7947	157,523 \pm 2,336	0,632 \pm 0,006	0,441 \pm 0,003	1,040 \pm 0,035
27	600	10	300	60	5,54 \pm 0,03	382,5 \pm 0,707	764,5 \pm 0,707	0,5364	154,644 \pm 8,239	0,837 \pm 0,005	0,448 \pm 0,002	1,098 \pm 0,089

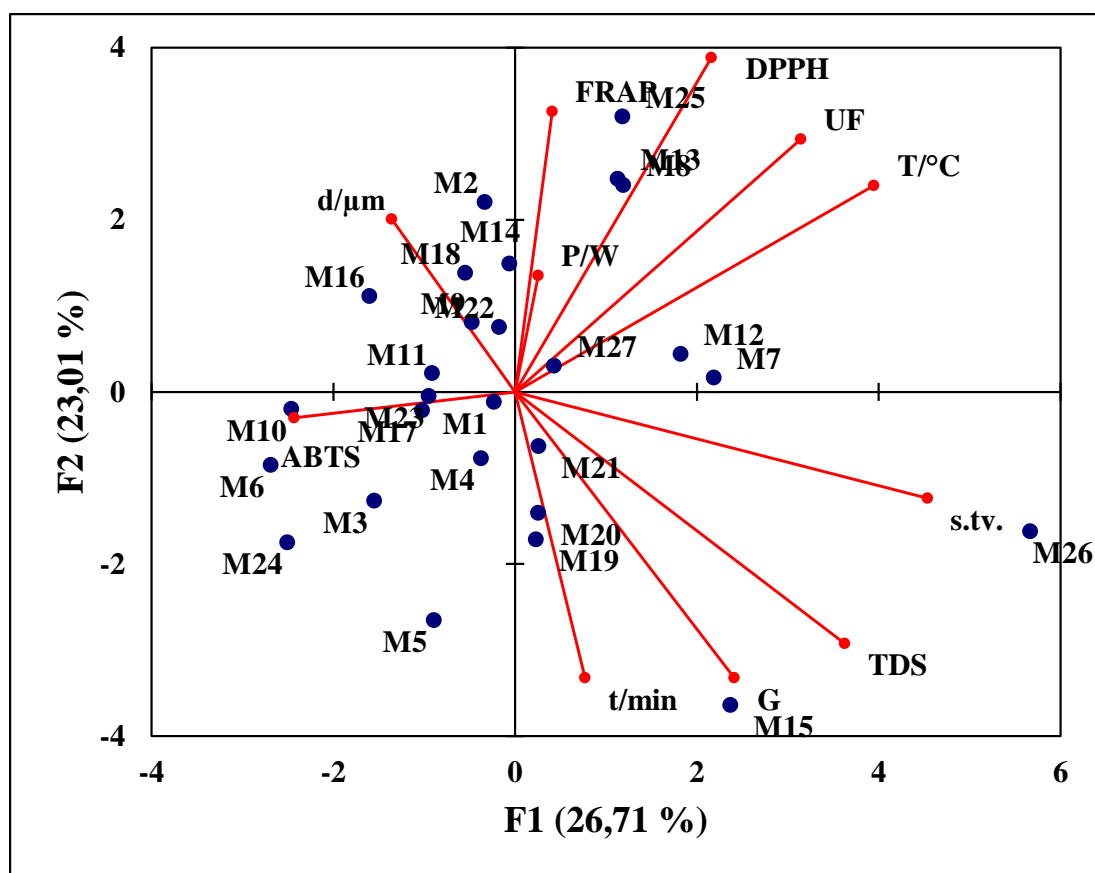
Tablica 8. Pearson-ova korelacijska matrica ulaznih i izlaznih veličina procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>d</i>	<i>T</i>	UF	ABTS	DPPH	FRAP	<i>TDS</i>	<i>G</i>	%s. tv.
<i>P</i>	1	0,000	0,000	0,000	0,294	-0,052	0,092	-0,033	-0,077	-0,220	0,015
<i>t</i>	0,000	1	0,000	0,000	-0,245	0,153	-0,167	-0,534	0,329	0,158	0,360
<i>d</i>	0,000	0,000	1	0,000	0,142	0,247	0,213	-0,100	-0,214	-0,384	-0,264
<i>T</i>	0,000	0,000	0,000	1	0,576	-0,456	0,621	0,187	0,180	-0,027	0,600
UF	0,294	-0,245	0,142	0,576	1	-0,089	0,570	0,216	0,248	0,050	0,345
ABTS	-0,052	0,153	0,247	-0,456	-0,089	1	-0,050	0,094	-0,063	0,038	-0,444
DPPH	0,092	-0,167	0,213	0,621	0,570	-0,050	1	0,381	-0,029	-0,142	0,112
FRAP	-0,033	-0,534	-0,100	0,187	0,216	0,094	0,381	1	-0,171	-0,128	-0,001
<i>TDS</i>	-0,077	0,329	-0,214	0,180	0,248	-0,063	-0,029	-0,171	1	0,751	0,701
<i>G</i>	-0,220	0,158	-0,384	-0,027	0,050	-0,038	-0,142	-0,128	0,751	1	0,347
%s. tv.	0,015	0,360	-0,264	0,600	0,345	-0,444	0,112	-0,001	0,701	0,350	1

Tablica 9. Multivarijatna analiza varijance (MANOVA) provedena na podacima UF, ABTS, DPPH, FRAP, TDS, G, postotak suhe tvari za postupak ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Varijacije parametara		<i>UF</i>	<i>ABTS</i>	<i>DPPH</i>	<i>FRAP</i>	<i>TDS</i>	<i>G</i>	<i>s.tv.</i>
<i>P</i>	400	120.12 ^a	0.64 ^a	0.42 ^a	0.96 ^a	369.08 ^a	738.75 ^a	0.53 ^a
	600	126.27 ^a	0.64 ^a	0.39 ^a	0.94 ^a	346.75 ^b	685.88 ^b	0.52 ^a
	800	133.32 ^b	0.63 ^a	0.43 ^a	0.94 ^a	361.67 ^a	710.42 ^b	0.53 ^a
<i>t</i>	5	134.45 ^b	0.60 ^a	0.42 ^a	1.24 ^b	351.83 ^b	713.58 ^b	0.53 ^a
	10	132.90 ^b	0.69 ^a	0.43 ^a	0.94 ^a	368.10 ^a	732.23 ^b	0.53 ^a
	15	123.46 ^a	0.65 ^a	0.40 ^a	0.83 ^a	383.33 ^c	734.00 ^b	0.60 ^b
<i>d</i>	100	124.40 ^a	0.61 ^a	0.40 ^a	0.97 ^a	380.83 ^c	769.33 ^c	0.57 ^a
	300	134.01 ^b	0.67 ^a	0.43 ^a	1.02 ^a	365.70 ^a	715.60 ^b	0.55 ^a
	500	130.76 ^b	0.69 ^a	0.42 ^a	0.90 ^a	360.33 ^a	719.83 ^b	0.52 ^a
<i>T</i>	40	121.32 ^a	0.74 ^b	0.40 ^a	0.93 ^a	363.75 ^a	726.08 ^b	0.50 ^a
	60	128.67 ^a	0.66 ^a	0.42 ^a	0.97 ^a	364.27 ^a	731.77 ^a	0.54 ^a
	80	147.18 ^c	0.59 ^a	0.46 ^a	1.07 ^a	381.00 ^c	722.67 ^b	0.61 ^b

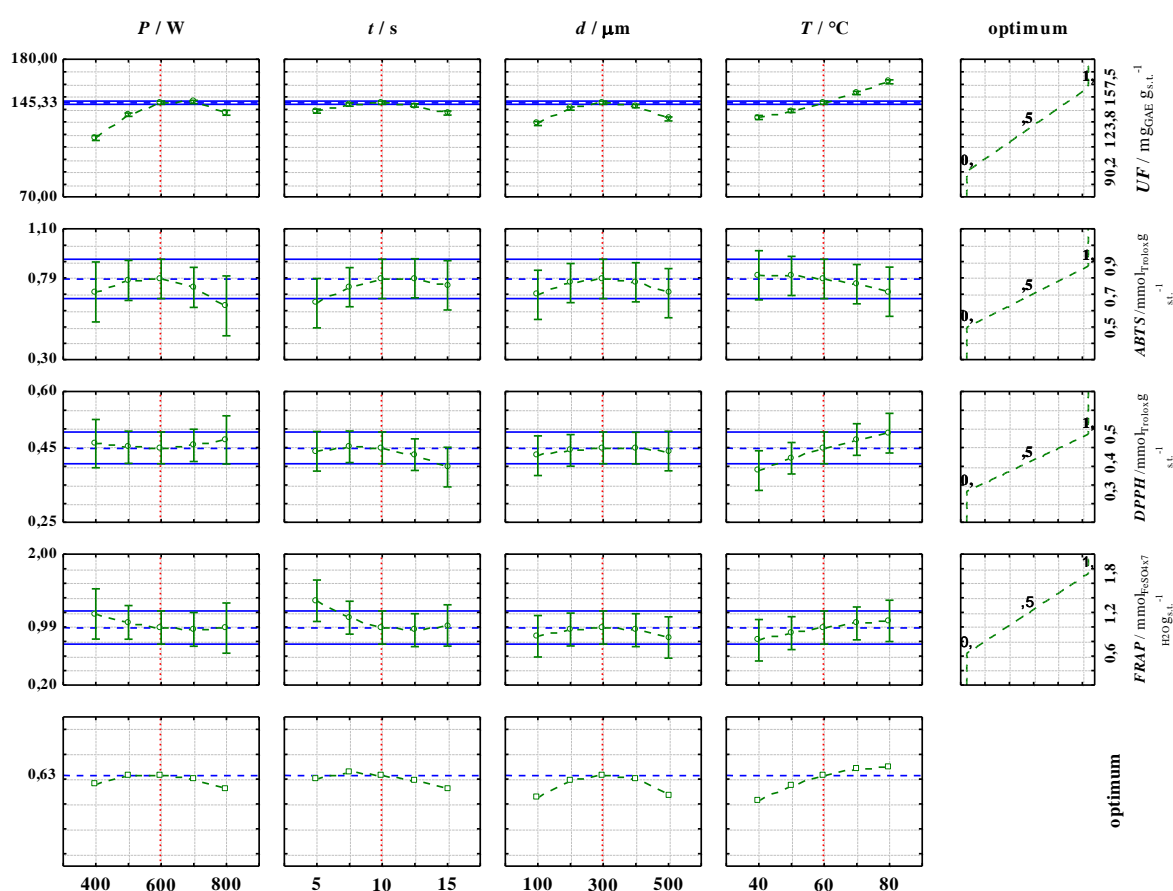
*različita slova u istom stupcu upućuju na značajno različitu vrijednost promatranog parametra ovisno o promatranim promjenama parametara (*P*, *t*, *d*, *T*)



Slika 10. Analiza osnovnih komponenata i promatranih veličina procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

4.2.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

U svrhu definiranja optimalnih procesnih uvjeta za provođenje ekstrakcije biološki aktivnih komponenata lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima primijenjena je metoda odzivne površine. Analiziran je utjecaj četiri varijable (snaga mikrovalova, vrijeme, veličina čestica i temperatura ekstrakcije) na tri razine (snaga mikrovalova $P = 400, 600$ i 800 W, vrijeme ekstrakcije $t = 5, 10$ i 15 , veličina čestica $d = 100, 300$ i 500 te temperatura ekstrakcije $T = 40, 60$ i 80 °C) na koncentraciju ukupnih polifenola te antioksidacijsku aktivnost određenu ABTS, DPPH i FRAP metodom simultano.



Slika 11. Optimalni uvjeti za ekstrakciju biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

Rezultati procjene optimalnih uvjeta ekstrakcije potpomognute mikrovalovima prikazani su na slici 11. Udio ukupnih polifenola nalazi se u intervalu od $UF = 70 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $UF = 180 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$, optimalni udio ukupnih polifenola iznosi $UF = 145,33 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Iz slike 11 možemo vidjeti da se udio ukupnih polifenola povećava s povećanjem snage mikrovalova i

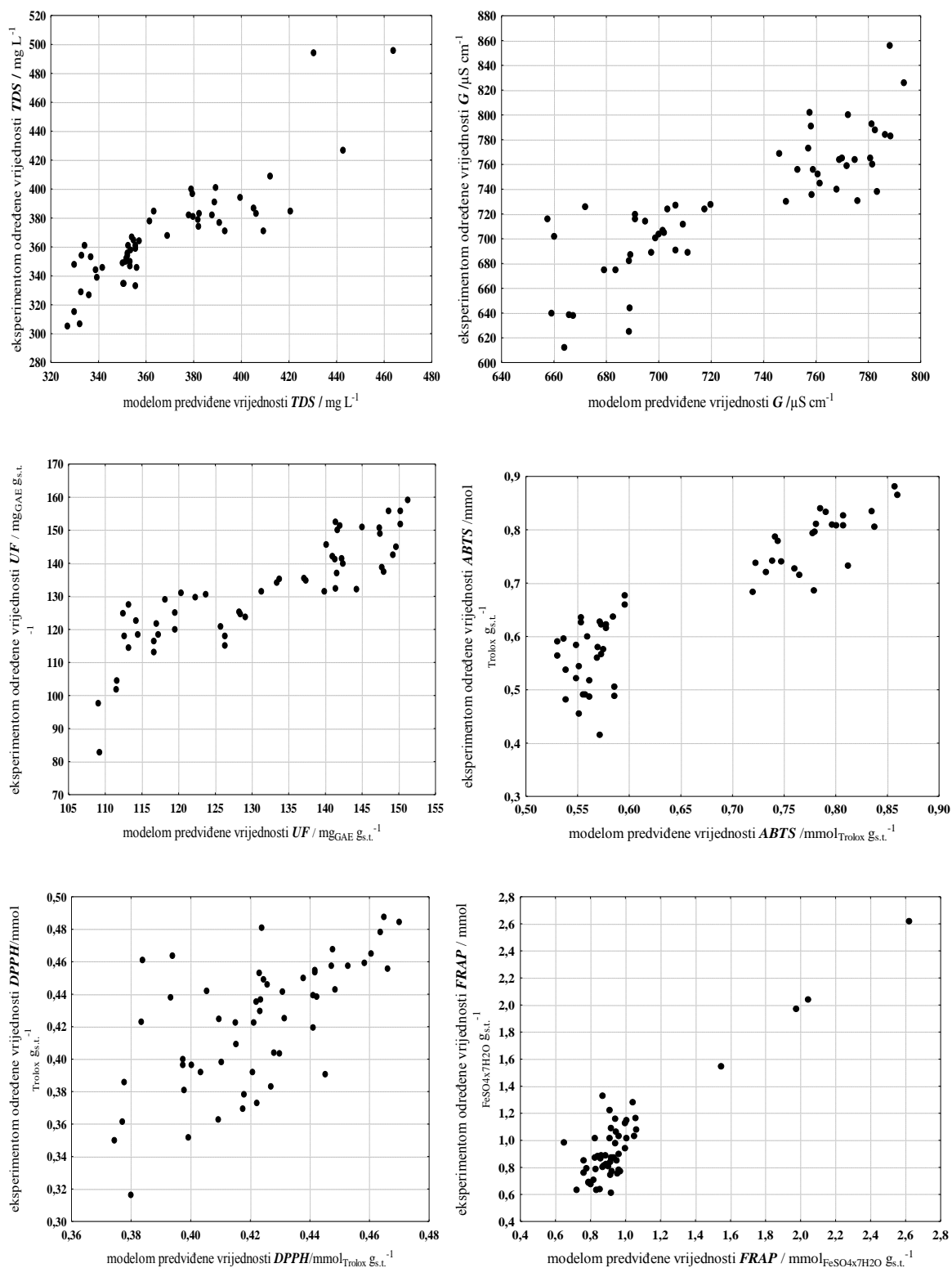
povećanjem temperature te da vrijeme ekstrakcije i temperatura ne utječu znatno na udio ukupnih polifenola. Također, možemo vidjeti da antioksidacijska aktivnost mjerena ABTS metodom nalazi u intervalu od $ABTS = 0,30 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $ABTS = 1,10 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ te da je optimalna vrijednost $ABTS = 0,79 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Povećanjem snage mikrovalova i temperature dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom dok produženjem vremena ekstrakcije dolazi do povećanja antioksidacijske aktivnosti. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom nalazi se u intervalu od $DPPH = 0,25 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $DPPH = 0,60 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ dok je optimalna vrijednost $0,45 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Možemo uočiti da povećanjem snage mikrovalova i temperature dovodi do povećanja antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom dok promjer čestica ne utječe antioksidacijske aktivnosti mjerene DPPH metodom. Optimalna antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom iznosi $FRAP = 0,99 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ te vidimo da povećanje snage mikrovalova i vrijeme ekstrakcije smanjuje antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom te da promjer čestica ne utječe na promjenu antioksidacijske aktivnosti. Iz slike 11 možemo vidjeti da su izračunati optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ukupnih polifenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom, FRAP metodom, DPPH metodom temperatura $T = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, vrijeme ekstrakcije $t = 10 \text{ min}$, promjer čestica $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$ te snaga mikrovalova $P = 600 \text{ W}$.

4.2.3. Modeli lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata iz lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

U okviru ovog rada upotrebljena je metoda lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na temelju ulaznih varijabli (snaga mikrovalova, vrijeme ekstrakcije, veličina čestica te temperatura ekstrakcije). U tablici 10 dani su procijenjeni parametri modela linearne regresije za fizikalna i kemijska svojstva vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima dok je na slici 12 dana usporedba eksperimentalnih vrijednosti i modela lokalne linearne regresije. Parametar B_0 predstavlja točku prijeloma pojedinog modela, parametar B_1 dolazi uz upotrijebljenu snagu mikrovalova, parametar B_2 uz vrijeme ekstrakcije, parametar B_3 uz promjer čestica te parametar B_4 uz temperaturu ekstrakcije. Analizom rezultata procijenjenih vrijednosti parametra može se uočiti da su procijenjene vrijednosti pouzdane budući da su izračunate standarde pogreške za minimalno jedan red veličine manje od procijenjene vrijednosti parametara. Na temelju toga može se zaključiti da se razvijeni modeli mogu pouzdano koristiti za predikciju fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline za analizirani raspon ulaznih varijabli. Isto tako važno je uočiti da procijenjeni parametri imaju i pozitivne i negativne vrijednosti što znači da imaju ili pozitivan ili negativan utjecaj na varijablu na koju se odnose (povećavaju ili smanjuju utjecaj pojedine varijable). Na primjer procijenjeni parametar B_1 ima pozitivan predznak uz ukupnu količinu ekstrahiranih polifenola i antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom dok ima negativan predznak za sve ostale ispitivane varijable. Prema tome možemo zaključiti da povećanje snage mikrovalova doprinosi povećanju ukupne količine ekstrahiranih polifenola i antioksidacijske aktivnosti izmjerene DPPH metodom. Slika 12 jasno pokazuje trend ovisnosti ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti, kako se mijenja udio ukupnih polifenola tako se mijenja i antioksidacijska aktivnost. Također se jasno vidi da antioksidacijske aktivnosti izmjerene ABTS metodom, DPPH metodom i FRAP metodom pokazuju sličan trend. Na temelju koeficijenta determinacije može se zaključiti da razvijeni model nije pouzdan za predviđanje svih analiziranih varijabli. Numerički gledano viša vrijednost koeficijenta determinacije dobivena je kod antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom ($R^2 = 0,915$), dok je najmanja vrijednost koeficijenta determinacije dobivena je kod antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom ($R^2 = 0,615$).

Tablica 10. Parametri modela lokalne linearne regresije za predviđanje ukupnih otopljenih tvari, vodljivosti, koncentracije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti (određenih ABTS, DPPH i FRAP metodama) vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima

zavisna varijabla	B_0	B_1	B_2	B_3	B_4	R^2
<i>TDS</i>	1118,487 ± 22,360	-0,022 ± 0,002	4,098 ± 0,041	0,029 ± 0,002	-3,740 · 10 ⁻³ ± 4,001 · 10 ⁻⁴	0,869
<i>G</i>	592,464 ± 46,547	-0,002 ± 0,004	3,146 ± 0,349	-0,054 ± 0,0418	0,399 ± 0,130	0,846
<i>UF</i>	49,731 ± 1,073	0,002 ± 0,003	0,469 ± 0,114	-0,001 ± 0,001	0,435 ± 0,158	0,869
<i>ABTS</i>	0,309 ± 0,101	-1,480 · 10 ⁻³ ± 1,666 · 10 ⁻⁴	0,002 ± 0,001	-8,400 · 10 ⁻⁵ ± 1,001 · 10 ⁻⁶	-2,197 · 10 ⁻³ ± 9,081 · 10 ⁻⁵	0,908
<i>DPPH</i>	0,159 ± 0,0156	2,500 · 10 ⁻⁴ ± 0,956 · 10 ⁻⁵	-0,002 ± 0,003	5,800 · 10 ⁻⁵ ± 2,781 · 10 ⁻⁶	0,002 ± 0,001	0,641
<i>FRAP</i>	14,051 ± 2,267	-0,306 ± 0,009	-31,376 ± 0,007	0,214 ± 0,002	-1,821 ± 0,006	0,915



Slika 12. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti i modela lokalne linearne regresije vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (a) TDS, (b) vodljivost, (c) UF, (d) ABTS, (e) DPPH i (f) FRAP.

4.3. Ekstrakcija biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom

Uporaba ultrazvuka smatra se obećavajućom i inovativnom metodom 21. stoljeća sa širokom uporabom u farmaceutskoj, kozmetičkoj i kemijskoj industriji.

4.3.1. Fizikalna i kemijska svojstva ekstrakata iz lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom

Provedena je vodena ekstrakcija biološki aktivnih molekula iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom. Kao i kod klasične ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima napravljen je plan eksperimenata primjenom metodologije odzivnih površina (RSM). Analiziran je utjecaj mikrovalova i ultrazvuka ($P=50$ W) na učinkovitost ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline. Analiziran je utjecaj snage mikrovalova, temperature ekstrakcije, vremena ekstrakcije te veličine čestica na tri nivoa, uz konstantnu snagu ultrazvuka. Od fizikalnih svojstava pripremljenim ekstraktima određivane su vrijednosti pH, ukupne otopljene tvari (TDS) i vodljivost dok je od kemijskih svojstava određivana koncentracija ukupnih polifenola te antioksidacijska aktivnost primjenom tri metode; ABTS, DPPH, FRAP. Rezultati fizikalnih i kemijskih analiza za svih 27 pripremljenih ekstrakata prikazani su u tablici 11. Analizom rezultata može se uočiti da je pH vrijednost u svim vodenim ekstraktima lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom približno jednak. Iz rezultata je vidljivo da je najniža ukupna otopljena tvar izmjerena u ekstraktu pripremljenom prema eksperimentalnim uvjetima broj 16 ($P = 600$ W, $t = 5$ min, $d = 500$ μ m, $T = 60$ °C) $TDS = 296 \pm 0$ mg L⁻¹ dok je najviša izmjerena u ekstraktu pripremljenom prema eksperimentalnim uvjetima broj 9 ($P = 600$ W, $t = 10$ min, $d = 300$ μ m, $T = 60$ °C) $TDS = 450 \pm 2,828$ mg L⁻¹. Električna vodljivost sposobnost je vodenih otopina da prenose struju, a ovisi o prisutnosti iona, njihovoj ukupnoj koncentraciji, o pokretljivosti i valenciji iona, te o temperaturi mjerenja i direktno je proporcionalna udjelu ukupne količine otopljene tvari u otopini (Gajdoš Kljusurić i sur., 2015).

Analiza rezultata kemijskih analiza pokazala je da je najveća količina ukupnih polifenola izmjerena u ekstraktu pripremljenom prema eksperimentalnim uvjetima broj 2 ($P = 800$ W, t

$= 5 \text{ min}$, $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$) $UF = 273,779 \pm 4,968 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ što je gotovo 3 puta više nego u ekstraktu pripremljenom prema eksperimentalnim uvjetima broj 11 ($P = 800 \text{ W}$, $t = 10 \text{ min}$, $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$) gdje je izmjerena količina ukupnih polifenola iznosila $UF = 98,924 \pm 7,168 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Iz rezultata prikazanih u tablici 11 možemo uočiti da produljenje vremena ekstrakcije ne utječe na količinu ekstrahiranih ukupnih polifenola te da se maksimum ekstrakcije postiže već za vrijeme od $t = 5 \text{ min}$. Kod određivanja antioksidacijskih aktivnosti pripremljenih ekstrakata prema FRAP i DPPH metodi uočeno je da najviša izmjerena vrijednost antioksidacijske aktivnosti izmjerena u ekstraktu pripremljenom prema eksperimentalnim uvjetima broj 2 ($P = 800 \text{ W}$, $t = 5 \text{ min}$, $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$) $FRAP = 1,837 \pm 0,026 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ i $DPPH = 0,933 \pm 0,042 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ dok je antioksidacijska aktivnost izmjerena ABTS metodom odstupala kao i kod klasične ekstrakcije.

Također, kao i kod prethodna dva procesa ekstrakcije provedena je analiza korelacijske matrice između nabrojanih svojstava kako bi se ispitala povezanost fizikalnih karakteristika i kemijskih svojstava pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline. U tablici 12 prikazane su vrijednosti koeficijenta korelacije između snage mikrovalova, temperature, promjera čestice, vremena ekstrakcije, ukupne otopljene tvari, vodljivosti, postotka ekstrahirane suhe tvari, koncentracije ukupnih fenola, antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom, antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom, antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom. Zanimljivo je uočiti da su kemijska svojstva (UF, ABTS, DPPH) pozitivno korelirana sa snagom mikrovalova dok je antioksidacijska aktivnost određena FRAP metodom negativno korelirana sa snagom mikrovalova. Također, možemo uočiti da je snaga mikrovalova pozitivno korelirana s ukupnom otopljenom tvari i vodljivosti. Na temelju dobivenih rezultata može se uočiti da su ukupna otopljena tvar i vodljivost negativno korelirane sa svim kemijskim svojstvima (UF, ABTS, DPPH, FRAP) i temperaturom. Može se također uočiti pozitivna korelacija ukupne otopljene tvari i vodljivosti sa snagom mikrovalova, vremenom ekstrakcije te postotkom ekstrahirane suhe tvari. Iz rezultata prikazanih u tablici 11 vidljivo je da su ukupni polifenoli pozitivno korelirani s antioksidacijskom aktivnosti mjerenom ABTS, DPPH i FRAP metodom, temperaturom ekstrakcije, dok su negativno korelirani s vremenom ekstrakcije, promjerom čestica i fizikalnim karakteristikama ekstrakata (TDS, G, postotak suhe tvari). Antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS, FRAP i DPPH metodom negativno su korelirane s fizikalnim karakteristikama (TDS, G, postotak suhe tvari) te vremenom ekstrakcije. U tablici 12 svi

statistički značajni koeficijenti korelacije obilježeni su crveno, a oni koji nisu značajni otisnuti su crnom bojom.

Kako bi se ispitao utjecaj ulaznih varijabli na izlazne varijable u procesu ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom primijenjena je multivarijatna analiza varijance (MANOVA). Analizom rezultata prikazanih u tablici 13 može se uočiti da na količinu ukupnih ekstrahiranih polifenola imaju utjecaj sve četiri ispitivane varijable. Na količinu ukupnih ekstrahiranih polifenola značajni utjecaj ima najviša korištena snaga mikrovalova, najkraće vrijeme ekstrakcije, najmanji korišteni promjer čestica te najviša temperatura što je veoma slično rezultatima MANOVA analize za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima. Na antioksidacijsku aktivnost pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline određenih ABTS metodom značajni utjecaj ima najviša korištena snaga mikrovalova te najkraće vrijeme provedbe ekstrakcije, dok na antioksidacijsku aktivnost pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline određenih DPPH metodom značajni utjecaj ima samo najkraće vrijeme ekstrakcije. Zanimljivo je također da ni jedna od ispitivanih ulaznih varijabli nema utjecaja na antioksidacijsku aktivnost pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline određenih FRAP metodom. Što se pak fizikalnih svojstava pripremljenih vodenih ekstrakata tiče, na ukupnu količinu otopljenih tvari značajni utjecaj ima vrijeme provedbe ekstrakcije, najveći korišteni promjer i najniža temperatura ekstrakcije. Na postotak ekstrahirane suhe tvari i vodljivost značajni utjecaj ima samo najkraće korišteno vrijeme ekstrakcije.

Grupiranje vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom na temelju njihovih fizikalnih i kemijskih svojstava analizirano je primjenom analize osnovnih komponenata (PCA). Rezultati analize osnovnih komponenta uzoraka vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom koja je obuhvatila snagu mikrovalova, vrijeme ekstrakcije, promjer čestica, temperaturu ekstrakcije, ukupne ekstrahirane polifenole, antioksidacijsku aktivnost izmjerenu ABTS, DPPH i FRAP metodom, ukupne otopljene tvari, vodljivost te udio ekstrahirane suhe tvari prikazani su na slici 13. Iz rezultata se može vidjeti da prva dva faktora opisuju 48,18 % varijance. Može se također uočiti da su se uzorci vodenih ekstrakata na temelju fizikalnih i kemijskih svojstava rasporedili u sva četiri kvadranta bez značajnog profila. Uzorci grupirani u prvom kvadrantu imali su najvišu izmjerenu vrijednost ekstrahirane suhe tvari, dok su uzorci u drugom kvadrantu imali najvišu količinu ukupnih polifenola te najvišu antioksidacijsku aktivnost izmjerenu FRAP metodom. S druge pak strane uzorci grupirani u trećem kvadrantu imali su

najvišu izmjerenu vrijednost antioksidacijske aktivnosti izmjerenu DPPH i ABTS metodom dok su uzorci u četvrtom kvadrantu imali najvišu izmjerenu vrijednost ukupne otopljen tvari i vodljivosti.

Tablica 11. Fizikalne i kemijske karakteristike pripremljenih vodenih ekstrakata lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom (rezultati su prikazani u obliku: srednja vrijednost \pm standardna devijacija)

Eksp.	$P /$ W	$t /$ min	$d /$ μm	$T /$ $^{\circ}\text{C}$	pH	$TDS /$ mg L^{-1}	$G /$ $\mu\text{S cm}^{-1}$	$\%s.tv.$	$UF /$ $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{s.t.}}^{-1}$	$ABTS /$ $\text{mmol}_{\text{Trolox}}^{-1}$ $\text{g}_{\text{s.t.}}$	$DPPH /$ $\text{mmol}_{\text{Trolox}}^{-1}$ $\text{g}_{\text{s.t.}}$	$FRAP /$ $\text{mmol}_{\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}}^{-1}$ $\text{g}_{\text{s.t.}}$
1	400	5	300	60	5,39 \pm 0,02	361,5 \pm 6,364	723,5 \pm 12,021	0,5486	146,858 \pm 2,417	0,558 \pm 0,143	0,469 \pm 0,009	0,770 \pm 0,168
2	800	5	300	60	5,35 \pm 0,04	361 \pm 1,414	721 \pm 2,828	0,3025	273,779 \pm 4,968	1,014 \pm 0,041	0,933 \pm 0,042	1,837 \pm 0,026
3	400	15	300	60	5,36 \pm 0,01	371,5 \pm 37,477	693 \pm 4,243	0,5603	147,805 \pm 3,628	0,386 \pm 0,047	0,456 \pm 0,005	1,452 \pm 0,874
4	800	15	300	60	5,28 \pm 0,01	401,5 \pm 0,707	802,5 \pm 3,536	0,5748	145,928 \pm 11,687	0,416 \pm 0,017	0,425 \pm 0,013	0,314 \pm 0,791
5	600	10	100	40	5,40 \pm 0,02	398,5 \pm 0,707	797 \pm 1,414	0,5034	139,686 \pm 1,229	0,934 \pm 0,005	0,422 \pm 0,030	0,836 \pm 0,029
6	600	10	500	40	5,47 \pm 0,01	386 \pm 1,414	770,5 \pm 0,707	0,5105	138,947 \pm 4,328	0,458 \pm 0,012	0,404 \pm 0,007	0,772 \pm 0,011
7	600	10	100	80	5,29 \pm 0,02	384 \pm 2,828	764,5 \pm 2,121	0,6313	160,582 \pm 0,560	0,409 \pm 0,061	0,474 \pm 0,014	1,070 \pm 0,018
8	600	10	500	80	5,32 \pm 0,04	361,5 \pm 2,121	725 \pm 2,828	0,5773	155,346 \pm 2,296	0,400 \pm 0,009	0,039 \pm 0,031	1,099 \pm 0,023
9	600	10	300	60	5,26 \pm 0,01	450 \pm 2,828	899,5 \pm 6,364	0,6772	141,953 \pm 1,044	0,371 \pm 0,013	0,456 \pm 0,011	0,466 \pm 0,028
10	400	10	300	40	5,40 \pm 0,02	381 \pm 1,414	769,5 \pm 3,536	0,5277	136,212 \pm 1,675	0,491 \pm 0,019	0,441 \pm 0,012	0,958 \pm 0,044
11	800	10	300	40	5,40 \pm 0,02	379 \pm 1,414	756 \pm 1,414	0,7152	98,924 \pm 7,168	0,609 \pm 0,016	0,323 \pm 0,002	0,659 \pm 0,033
12	400	10	300	80	5,35 \pm 0,01	354 \pm 1,414	711 \pm 2,828	0,5816	154,739 \pm 6,687	0,615 \pm 0,205	0,601 \pm 0,007	1,299 \pm 0,191
13	800	10	300	80	5,35 \pm 0,01	360,5 \pm 6,364	717,5 \pm 17,678	0,6045	155,800 \pm 10,381	0,446 \pm 0,095	0,486 \pm 0,002	0,962 \pm 0,048
14	600	5	100	60	5,36 \pm 0,01	365,5 \pm 0,707	728 \pm 1,414	0,5635	248,462 \pm 4,706	0,521 \pm 0,002	0,544 \pm 0,011	0,949 \pm 0,055
15	600	15	100	60	5,33 \pm 0,01	409,5 \pm 2,121	820 \pm 5,657	0,5639	147,407 \pm 6,897	0,499 \pm 0,024	0,438 \pm 0,016	0,876 \pm 0,059
16	600	5	500	60	5,47 \pm 0,01	296 \pm 0	594 \pm 1,414	0,4162	157,989 \pm 8,071	1,024 \pm 0,370	0,506 \pm 0,012	1,096 \pm 0,059
17	600	15	500	60	5,38 \pm 0,01	390,5 \pm 7,778	779,5 \pm 14,849	0,5577	154,320 \pm 2,694	0,457 \pm 0,011	0,464 \pm 0,018	0,978 \pm 0,032
18	600	10	300	60	5,29 \pm 0,03	412 \pm 2,828	823 \pm 2,828	0,5824	142,185 \pm 4,097	0,675 \pm 0,269	0,491 \pm 0,013	0,907 \pm 0,019
19	400	10	100	60	5,30 \pm 0,01	406,5 \pm 0,707	810,5 \pm 2,121	0,5649	136,310 \pm 5,320	0,524 \pm 0,018	0,425 \pm 0,025	0,885 \pm 0,016
20	800	10	100	60	5,31 \pm 0,03	414 \pm 1,414	826 \pm 1,414	0,5637	140,470 \pm 1,098	0,759 \pm 0,282	0,435 \pm 0,002	0,894 \pm 0,026
21	400	10	500	60	5,29 \pm 0,01	395,5 \pm 2,121	792,5 \pm 3,536	0,4868	164,974 \pm 13,254	0,534 \pm 0,049	0,563 \pm 0,003	1,178 \pm 0,041
22	800	10	500	60	5,32 \pm 0,02	398,5 \pm 0,707	795 \pm 1,414	0,5718	139,479 \pm 10,821	0,504 \pm 0,028	0,445 \pm 0,016	1,007 \pm 0,002
23	600	5	300	40	5,40 \pm 0,03	317,5 \pm 2,121	670 \pm 9,900	0,5155	134,462 \pm 7,030	0,571 \pm 0,068	0,455 \pm 0,002	1,061 \pm 0,004
24	600	15	300	40	5,48 \pm 0,01	382 \pm 0,707	765,5 \pm 7,778	0,5064	136,503 \pm 0,349	0,495 \pm 0,039	0,469 \pm 0,045	0,935 \pm 0,013
25	600	5	300	80	5,32 \pm 0,01	352 \pm 1,414	703 \pm 4,243	0,5508	163,048 \pm 0,160	0,479 \pm 0,002	0,574 \pm 0,009	1,315 \pm 0,028
26	600	15	300	80	5,23 \pm 0,01	405 \pm 0	810,5 \pm 0,707	0,6162	155,496 \pm 1,004	0,415 \pm 0,048	0,469 \pm 0,025	1,222 \pm 0,013
27	600	10	300	60	5,31 \pm 0,02	386,5 \pm 4,950	774,5 \pm 9,192	0,5363	150,806 \pm 8,900	0,497 \pm 0,069	0,429 \pm 0,024	1,233 \pm 0,004

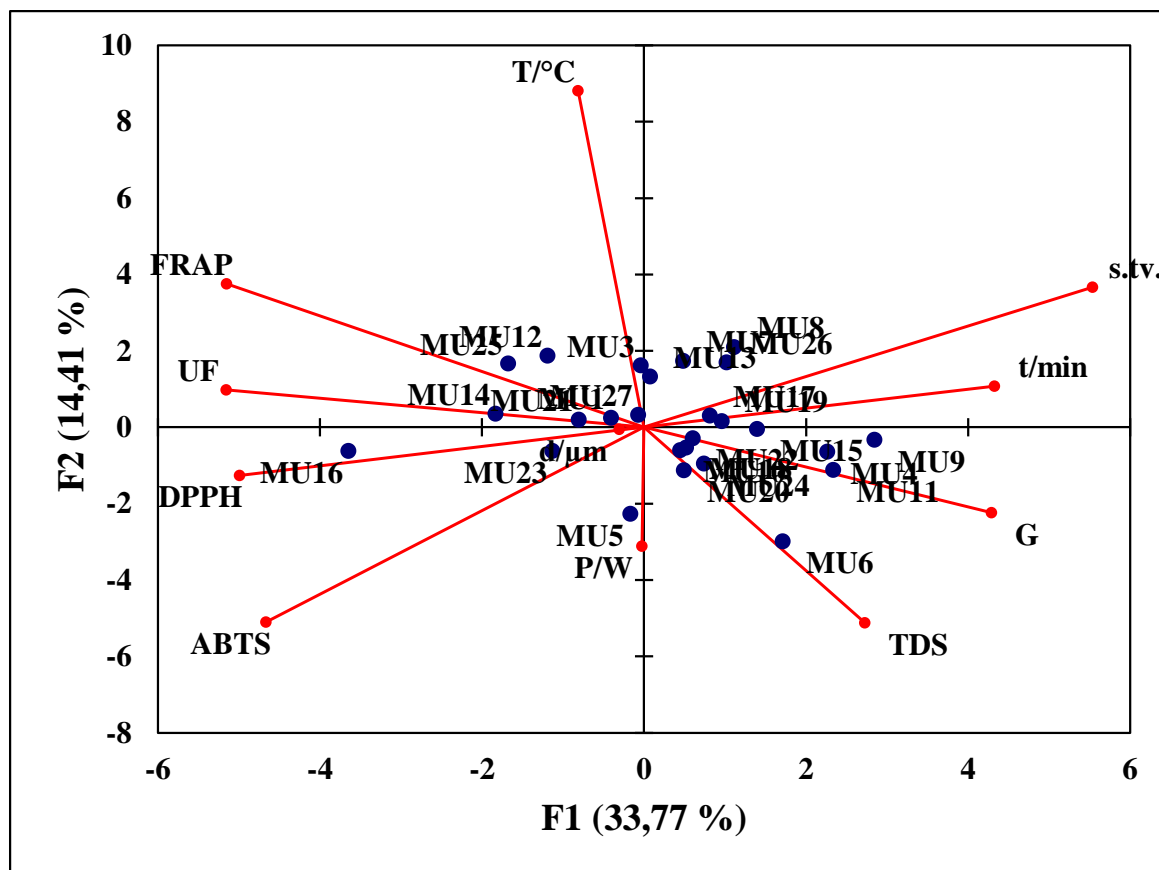
Tablica 12. Pearson-ova korelacijska matrica ulaznih i izlaznih veličina procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom

	<i>P</i>	<i>t</i>	<i>d</i>	<i>T</i>	UF	ABTS	DPPH	FRAP	TDS	G	%s.tv.
<i>P</i>	1	0,000	0,000	0,000	0,114	0,202	0,039	-0,165	0,031	0,110	0,046
<i>t</i>	0,000	1	0,000	0,000	-0,401	-0,472	-0,315	-0,237	0,213	0,497	0,356
<i>d</i>	0,000	0,000	1	0,000	-0,105	-0,085	-0,132	0,118	0,164	-0,271	-0,200
<i>T</i>	0,000	0,000	0,000	1	0,271	-0,250	0,054	0,331	-0,287	-0,091	0,209
UF	0,114	-0,401	-0,105	0,271	1	0,307	0,650	0,547	-0,166	-0,234	-0,566
ABTS	0,202	-0,472	-0,085	-0,250	0,307	1	0,448	0,286	-0,232	-0,318	-0,644
DPPH	0,039	-0,315	-0,132	0,054	0,650	0,448	1	0,509	-0,140	-0,147	-0,562
FRAP	-0,165	-0,237	0,118	0,331	0,547	0,286	0,509	1	-0,304	-0,480	-0,555
TDS	0,031	0,213	0,164	-0,287	-0,166	-0,232	-0,140	-0,304	1	0,402	0,068
G	0,110	0,497	-0,271	-0,091	-0,234	-0,318	-0,147	-0,480	0,402	1	0,426
%s.tv.	0,046	0,356	-0,200	0,209	-0,566	-0,644	-0,562	-0,555	0,068	0,426	1

Tablica 13. Multivarijatna analiza varijance (MANOVA) provedena na podacima UF, ABTS, DPPH, FRAP, TDS, G, postotak suhe tvari za postupak ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom

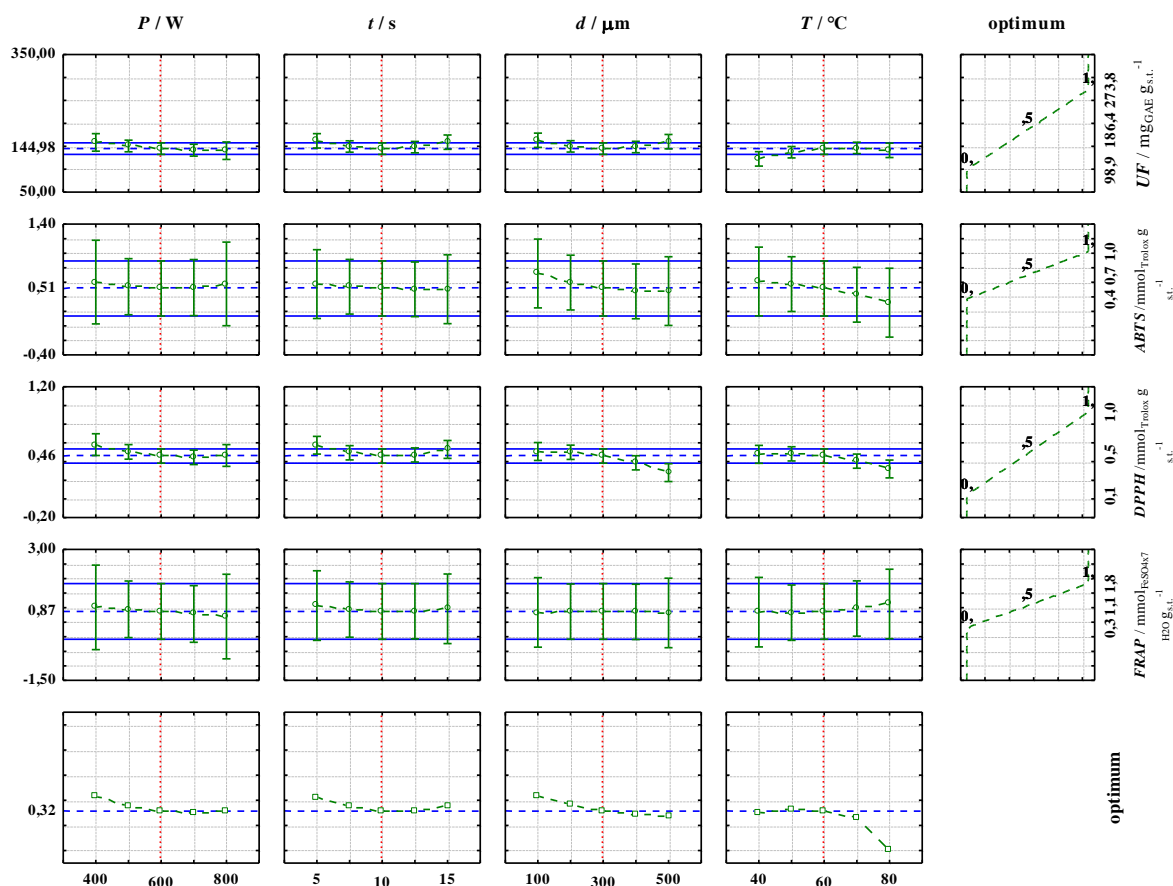
Varijacije parametara		<i>UF</i>	<i>ABTS</i>	<i>DPPH</i>	<i>FRAP</i>	<i>TDS</i>	<i>G</i>	<i>s.tv.</i>
<i>P</i>	400	147,82 ^a	0,52 ^a	0,49 ^a	1,09 ^a	378,33 ^a	750,00 ^a	0,54 ^a
	600	145,45 ^a	0,51 ^a	0,41 ^a	0,93 ^a	380,22 ^a	714,03 ^a	0,52 ^a
	800	159,06 ^b	0,63 ^b	0,51 ^a	0,95 ^a	385,75 ^a	769,67 ^a	0,56 ^a
<i>t</i>	5	187,43 ^b	0,69 ^b	0,58 ^b	1,17 ^a	342,25 ^a	689,92 ^b	0,48 ^b
	10	143,76 ^a	0,55 ^a	0,43 ^a	0,95 ^a	416,97 ^b	782,13 ^a	0,58 ^a
	15	147,91 ^a	0,44 ^a	0,45 ^a	0,96 ^a	393,33 ^a	778,50 ^a	0,56 ^a
<i>d</i>	100	162,15 ^b	0,61 ^a	0,46 ^a	0,92 ^a	396,33 ^a	791,00 ^a	0,57 ^a
	300	152,30 ^a	0,54 ^a	0,50 ^a	1,03 ^a	378,33 ^a	756,00 ^a	0,56 ^a
	500	151,84 ^a	0,56 ^a	0,40 ^a	1,02 ^a	435,83 ^b	742,75 ^a	0,52 ^a
<i>T</i>	40	130,79 ^a	0,59 ^a	0,42 ^a	0,87 ^a	438,50 ^b	754,75 ^a	0,55 ^a
	60	162,58 ^b	0,58 ^a	0,50 ^a	0,99 ^a	388,00 ^a	772,17 ^a	0,54 ^a
	80	157,50 ^b	0,46 ^a	0,44 ^a	1,16 ^b	369,50 ^a	738,58 ^a	0,59 ^a

*različita slova u istom stupcu upućuju na značajno različitu vrijednost promatranog parametra ovisno o promatranim promjenama parametara (*P*, *t*, *d*, *T*)



Slika 13. Analiza osnovnih komponenata i promatranih veličina procesa ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom

4.3.2. Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom



Slika 14. Optimalni uvjeti za ekstrakciju biološki aktivnih komponenata iz lista masline postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom

Kako bismo dobili optimalne uvjete ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz lista masline u postupku ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom provedeno je optimiranje svih ulaznih veličina (snaga mikrovalova, vrijeme ekstrakcije, veličina čestica i temperatura ekstrakcije) te njihov utjecaj na ukupne polifenole i antioksidacijsku aktivnost mjerenu ABTS, DPPH i FRAP metodom simultano. U pripremljenim vodenim ekstraktima lista masline udio ukupnih polifenola nalazi se u intervalu od $UF = 50 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $UF = 350 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ dok prema metodi optimalni udio ukupnih polifenola iznosi $UF = 144,98 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Iz slike 14 uočava se da povećanjem temperature ekstrakcije dolazi do laganog porasta ukupnih polifenola, te da snaga mikrovalova, vrijeme ekstrakcije i promjer čestica ne utječu na količinu ekstrahiranih ukupnih polifenola. Također, može se vidjeti da se antioksidacijska aktivnost mjerena ABTS metodom nalazi u intervalu između $ABTS = 0,40 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $ABTS = 1,40 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ te da je prema metodi odzivne površine optimalna vrijednost $ABTS = 0,51 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Možemo također uočiti da povećanjem

temperature dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom nalazi se u intervalu između $DPPH = 0,20 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ do $DPPH = 1,20 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$ dok je optimalna vrijednost $DPPH = 0,46 \text{ mmol}_{\text{Trolox}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$. Možemo uočiti da pri većoj temperaturi i promjeru čestica dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti. Optimalna antioksidacijska aktivnost mjerena FRAP metodom iznosi $FRAP = 0,87 \text{ mmol}_{\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}} \text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$.

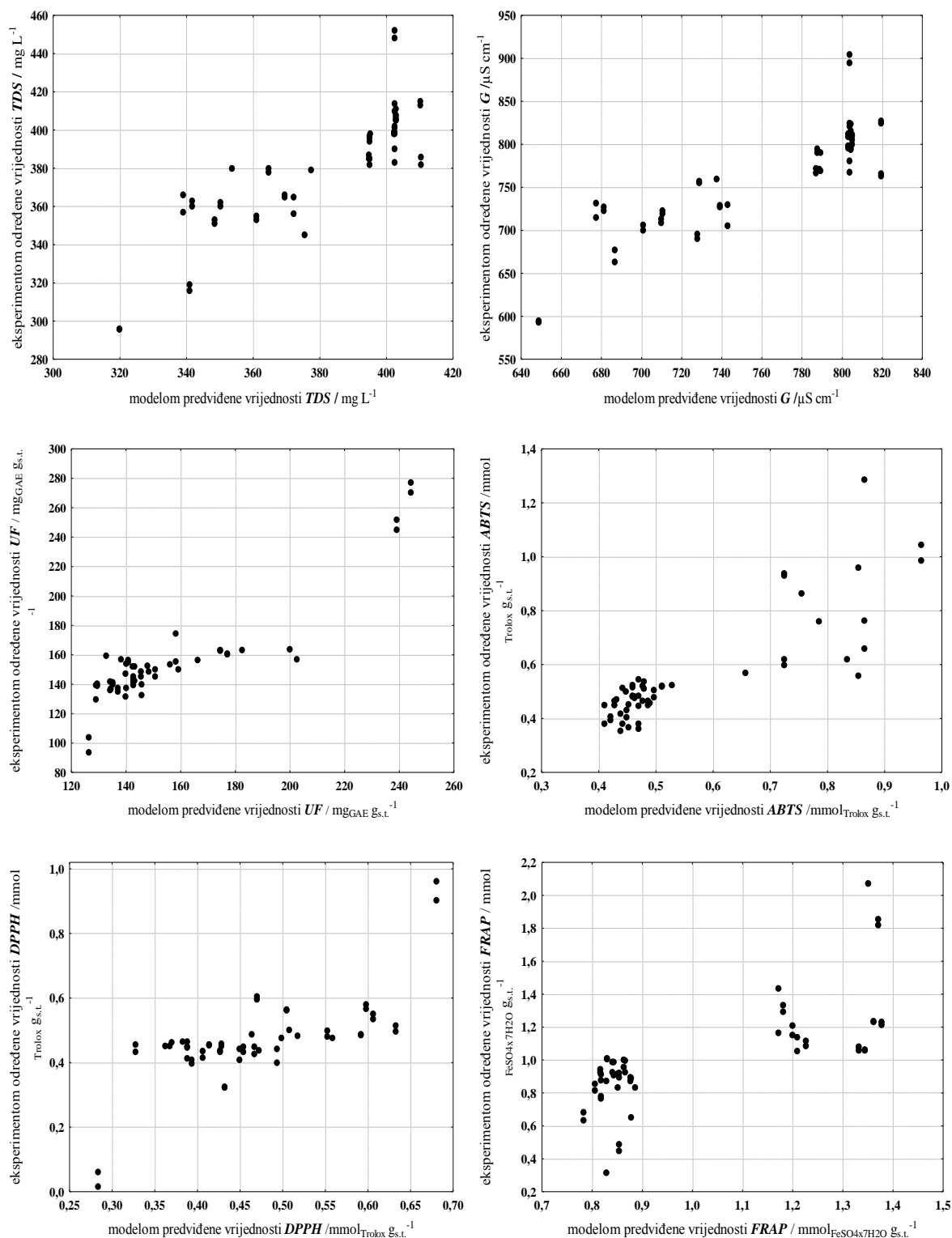
Iz slike 14 možemo vidjeti da su procijenjeni optimalni uvjeti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom ukupnih polifenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom, FRAP metodom, DPPH metodom temperatura $T = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, vrijeme ekstrakcije $t = 10 \text{ min}$, promjer čestica $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$ te snaga mikrovalova $P = 600 \text{ W}$.

4.3.3. Modeli lokalne linearne regresije za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava ekstrakata iz lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom

Metoda lokalne linearne regresije upotrijebljena je za predviđanje fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom na temelju ulaznih varijabli (snaga mikrovalova, vrijeme ekstrakcije, veličina čestica te temperatura ekstrakcije). U tablici 14 dani su procijenjeni parametri modela linearne regresije za fizikalna i kemijska svojstva vodenih ekstrakata lista masline dok je na slici 15 dana usporedba eksperimentalnih vrijednosti i modela lokalne linearne regresije. Parametar B_0 predstavlja točku prijeloma pojedinog modela, parametar B_1 dolazi uz upotrijebljenu snagu mikrovalova, parametar B_2 uz vrijeme ekstrakcije, parametar B_3 uz promjer čestica te parametar B_4 uz temperaturu ekstrakcije. Analizom rezultata procijenjenih vrijednosti parametra može se uočiti da su procijenjene vrijednosti pouzdane budući da su izračunate standarde pogreške za minimalno jedan red veličine manje od procijenjene vrijednosti parametara. Na temelju toga može se zaključiti da se razvijeni modeli mogu pouzdano koristiti za predikciju fizikalnih i kemijskih svojstava vodenih ekstrakata lista masline za analizirani raspon ulaznih varijabli. Isto tako važno je uočiti da procijenjeni parametri imaju i pozitivne i negativne vrijednosti što znači da imaju ili pozitivan ili negativan utjecaj na varijablu na koju se odnose (povećavaju ili smanjuju utjecaj pojedine varijable). Na primjer, procijenjeni parametra B_1 ima pozitivan predznak uz sve ispitivane varijable. Prema tome možemo zaključiti da povećanje snage mikrovalova doprinosi povećanju vrijednosti i fizikalnih i kemijskih svojstava pripremljenih ekstrakata. S druge pak strane, procijenjeni parametar B_4 (dolazi uz temperaturu ekstrakcije) ima pozitivan utjecaj na sve ispitivane varijable osim na antioksidacijsku aktivnost izmjerenu DPPH metodom. Slika 15 jasno pokazuje trend ovisnosti ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti, kako se mijenja udio ukupnih polifenola tako se mijenja i antioksidacijska aktivnost. Također se jasno vidi da antioksidacijske aktivnosti izmjerene ABTS metodom, DPPH metodom i FRAP metodom pokazuju sličan trend. Na temelju koeficijenta determinacije može se zaključiti da razvijeni model nije pouzdan za predviđanje svih analiziranih varijabli. Numerički gledano viša vrijednost koeficijenta determinacije dobivena je kod ukupne količine polifenola ($R^2 = 0,899$), dok je najmanja vrijednost koeficijenta determinacije dobivena je kod antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom ($R^2 = 0,705$).

Tablica 14. Parametri modela lokalne linearne regresije za predviđanje ukupnih otopljenih tvari, vodljivosti, koncentracije ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti (određenih ABTS, DPPH i FRAP metodama) vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom

zavisna varijabla	B_0	B_1	B_2	B_3	B_4	R^2
<i>TDS</i>	393,073 ± 33,591	0,018 ± 0,003	-0,737 ± 0,364	-0,019 ± 0,002	0,195 ± 0,018	0,851
<i>G</i>	779,098 ± 66,520	0,041 ± 0,008	-1,360 ± 0,506	-0,038 ± 0,002	0,413 ± 0,035	0,855
<i>UF</i>	116,946 ± 32,614	0,123 ± 0,026	-3,363 ± 0,532	-0,097 ± 0,017	0,549 ± 0,225	0,899
<i>ABTS</i>	0,625 ± 0,075	2,490 · 10 ⁻⁴ ± 2,800 · 10 ⁻⁵	-0,032 ± 0,005	-2,450 · 10 ⁻⁴ ± 7,900 · 10 ⁻⁶	0,004 ± 0,001	0,843
<i>DPPH</i>	0,550 ± 0,060	3,040 · 10 ⁻⁴ ± 5,500 · 10 ⁻⁶	-0,013 ± 0,006	-2,490 · 10 ⁻⁵ ± 6,600 · 10 ⁻⁶	-0,002 ± 0,002	0,705
<i>FRAP</i>	0,799 ± 0,162	5,410 · 10 ⁻⁴ ± 1,460 · 10 ⁻⁶	0,019 ± 0,008	-2,630 · 10 ⁻⁴ ± 3,100 · 10 ⁻⁶	0,002 ± 0,001	0,726



Slika 15. Usporedba eksperimentalnih vrijednosti i modela lokalne linearne regresije vodenih ekstrakata lista masline pripremljenih postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom (a) TDS, (b) vodljivost, (c) UF, (d) ABTS, (e) DPPH i (f) FRAP.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultat istraživanja mogu se postaviti slijedeći zaključci:

1. Izmjereni optimalni uvjeti klasične ekstrakcije za izolaciju ukupnih polifenola iz vodenog ekstrakta lista masline su: $t = 15 \text{ min}$, $T = 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $rpm = 500 \text{ min}^{-1}$ i $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$. Pri tim uvjetima dobivena vrijednost ukupnih fenola iznosi $UF = 194,272 \pm 3,271 \text{ mg}_{\text{GAE gs.t}}^{-1}$.
2. Izračunati optimalni uvjeti klasične ekstrakcije ukupnih polifenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom, FRAP metodom, DPPH metodom su: temperatura $T = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, vrijeme ekstrakcije $t = 10 \text{ min}$, promjer čestica $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$ te brzina miješanja $rpm = 500 \text{ min}^{-1}$. Prema modelu optimalni udio ukupnih polifenola iznosi $UF = 152,12 \text{ mg}_{\text{GAE gs.t}}^{-1}$.
3. Analizom rezultata prikazanih pomoću MANOVE (multivarijatna analiza varijance) za postupak klasične ekstrakcije prikazuje da na količinu ukupnih ekstrahiranih polifenola najviše utječe promjena vremena ekstrakcije, dok ostali parametri nemaju značajan utjecaj.
4. Izmjereni optimalni uvjeti za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima su: $P = 600 \text{ W}$, $t = 15 \text{ min}$, $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, te pri tim uvjetima vrijednost ukupnih polifenola iznosi $UF = 157,523 \pm 2,336 \text{ mg}_{\text{GAE gs.t}}^{-1}$.
5. Izračunati optimalni uvjeti za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima polifenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom, FRAP metodom, DPPH metodom su: temperatura $T = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, vrijeme ekstrakcije $t = 10 \text{ min}$, promjer čestica $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$ te snaga mikrovalova $P = 600 \text{ W}$. Prema modelu optimalni udio ukupnih polifenola iznosi $UF = 145,33 \text{ mg}_{\text{GAE gs.t}}^{-1}$.
6. Analizom rezultata prikazanih pomoću MANOVE (multivarijatna analiza varijance) za postupak ekstrakcije potpomognute mikrovalovima na količinu ukupnih ekstrahiranih polifenola najviše utječu: najviša korištena snaga mikrovalova, najduže vrijeme ekstrakcije, najmanji korišteni promjer čestica te najviša temperatura ekstrakcije.
7. Izmjereni optimalni uvjeti za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima i ultrazvukom $P = 800 \text{ W}$, $t = 5 \text{ min}$, $d = 300 \text{ }\mu\text{m}$, $T = 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ te pri tim uvjetima vrijednost ukupnih polifenola iznosi $UF = 273,779 \pm 4,968 \text{ mg}_{\text{GAE gs.t}}^{-1}$.
8. Izračunati optimalni uvjeti za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima i ultrazvukom polifenolnih tvari i antioksidacijske aktivnosti mjerene ABTS metodom, FRAP

metodom, DPPH metodom temperatura $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$, vrijeme ekstrakcije $t = 10\text{ min}$, promjer čestica $d = 300\text{ }\mu\text{m}$ te snaga mikrovalova $P = 600\text{ W}$. Prema modelu optimalni udio ukupnih polifenola iznosi $UF = 144,98\text{mg}_{\text{GAE}}\text{ g}_{\text{s.t.}}^{-1}$.

9. Na količinu ukupnih ekstrahiranih polifenola postupkom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i ultrazvukom značajni utjecaj ima najviša korištena snaga mikrovalova, najkraće vrijeme ekstrakcije, najmanji promjer čestica te najviša temperatura što je veoma slično rezultatima MANOVA analize za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima.
10. Klasična ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima te ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ultrazvukom jasno pokazuju trend ovisnosti ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnost, kako se mijenja udio ukupnih polifenola tako se mijenja i antioksidacijska aktivnost.

6. LITERATURA

- Abascal, K., Ganora, L., Yarnell, E. (2005) The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytother. Res.* **19**, 655-660.
- Abaza, L., Taamallii, A., Nsir, H., Zarrouk, M. (2015) Olive Tree (*Olea europaea* L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. *Antioxidants*. **4**, 682-698.
- Abert, V. M., Fernandez, X., Visinoni, F., Chemat, F. (2008) Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *J. Chrom. A*. **1190**, 14-17.
- Al-Marazeeq, K., Haddadin, M. S. Y., Abdulla, B., Haddadin, J.S. (2016) Biological activities of olive leaves extract from nabali baladi variety against lipid and protein oxidation. *Int. J. Biol. Biotech.* **13** (2), 283-291.
- Anderson-Cook, C. M., Borror, C. M., Montgomery, Douglas C. (2009) "Response surface design evaluation and comparison". *J. of Stat. Plan. and Inference*. **39**, 629-641.
- Andreadou, I., Iliodromitis, E. K., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A., Kremastinos, D. T. (2006) The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J. Nutr.* **136**, 2213–2219.
- Andrikopoulos, N.K., Antonopoulou, S., Kaliora, A.C. (2002) Oleuropein inhibits LDL oxidation induced by cooking oil frying by products and platelet aggregation induced by platelet-activating factor. *Lebensm. Wiss. Technol.* **35**, 479–484.
- Anonymus, (2017) <https://www.google.hr/search?q=list+masline&source=lnms&tbm=isch&s_a=X&ved=0ahUKewj5wbXFluvUAhWIqxoKHcgxDpMQ_AUICigB&biw=1366&bih=662>. Pristupljeno 1. srpnja, 2017.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D. (2000) Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*. **125**, 989–1009.
- Benavente-Garcia, J., Castillo, J., Lorente, A., Ortuno, A., Del Rio, J. A. (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* **68**, 457–462.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

- Biesalski, H. K. (2007) Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **10**, 724-728.
- Bilgin, M., Şahin, S. (2013) Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **44**, 8–12.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A. (1999) On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* **51**, 971–974.
- Blekić, M., Jambrak, R. A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3** (1), 32-47.
- Böhm, H., Boeining, H., Hempel, J., Raab, B., Kroke A. (1998) Flavonols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z. Ernährungswiss.* **37**, 147-163.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* **28**, 25-30.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.
- Bursać Kovačević, D., Gajdoš Kljusurić, J., Putnik, P., Vukušić, T., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V. (2016) Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase Plasma, *Food Chem.* **212**, 323-331.
- Cacace, J. E., Mazza, G. (2002) Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5939-5946.
- Caili, F., Haijun, T., Quanhong, L., Tongyi, C., Wenjuan, D. (2006) Ultrasound assisted extraction of xyloglucan from apple pomace. *Ultrason. Sonochem.* **13**, 511-516.
- Dai, J., Mumper, J. R. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules.* **15**, 7313-7352.
- Drmić, H., Jambrak, R. A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2** (2) 22-33.
- Eberhardt, M. V., Lee, C. Y., Liu, R. H. (2000) Antioxidant activity of fresh apples. *Nature.* **405**, 903–904.

- El, N. S., Karakaya, S. (2009) Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr. Rev.* **67**(11), 632–638.
- Escarpa, A., Gonzalez, M. C. (2001) An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **31**, 57-139.
- Gajdoš Kljusurić, J., Benković, M., Bauman, I. (2015) Classification and processing optimization of barley milk production using NIR spectroscopy, particle size, and total dissolved solids analysis. *J. Chem.* **201**(5), 1-7.
- Ganesan, K., Kumar, K. S., Rao, P. V. S. (2011) Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innov Food Sci Emerg.* **12**, 73–78.
- Gucci, R., Lombardini, L., Tattini, M. (1997) Analysis of leaf water relations in leaves of two olive (*Olea europaea*) cultivars differing in tolerance to salinity. *Tree Physiol.* **17**, 13–21.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Meth Enzymol.* **186**, 1–85.
- Hamdi, K.H., Castellon, R. (2005) Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an antitumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 769–778.
- Havlikova, L., Mikova, K. (1985) Heat stability of anthocyanins. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **181**, 427-432.
- Jain, T., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A., Shukla, S. S. (2009) Microwave assisted extraction for phytoconstituents- An overview. *Asian J. Res. Chem.* **2** (1), 19- 25.
- Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J. M., Luque de Castro, M. D. (2006) Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr.* **1108**, 76-82.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., Sayadi, S. (2008) Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem. Biol. Interact.* **176**, 88–98.
- Kaushik, R., Pradeo, N., Vamshi, V., Geetha, M., Usha, A. (2010) Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *J. Food Sci. i Tehc.* **47**, 27-33.

- Kazazić, S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig Rada Toksikol.* **55**, 279-290.
- Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J. M., Moutounet, M. (1999) Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2719-2723.
- Manach, C., Schalkert, A., Morand, C., Rémèsy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747.
- Middleton E. J., Kandaswami C., Theoharides, T. C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**, 673-751.
- Mujić, I., Tivković, J., Nikolić, G., Vidović, S., Trutić, N., Kosić, U., Jokić, S., Ruznić, A. (2011) Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract as a Source of Useful Antioxidants. *Cro. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **6 (3-4)**, 129-133.
- Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011) Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics* **3**, 793-829.
- Omar, S. H. (2010) Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharm. J.* **18**, 111–121.
- Peralbo-Molina, A., de Castro, M. D. (2013) Potential of residues from the Mediterranean agriculture and agrifood industry. *Trends Food Sci. Technol.* **32**, 16–24.
- Pereira, A.P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentao, P., Paula, B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A. (2007) Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules.* **12**, 1153–1162.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Nunez, M. (2005). A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: catechin, resveratrol, and grape extract cases. *Eur. Food Res. Technol.* **221(3-4)**, 284–290.
- Prior, R. L. , Xu, X. (2013) Diet Antioxidant Capacity: Relationships to Oxidative Stress and Health. *Am. J. Biomed. Sci.* **5(2)**, 126-139.
- Quan, P. T., Hang T. V., Ha, N. H., De, N. X., Tuyen T. N. (2006). Microwave-assisted extraction of polyphenols from fresh tea shoot. *Tap Chi Phat Trien Kh&Cn.* **9 (8)**, 69-75.

- Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., Khomeiri, M. (2011) Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.* **21**, 738–745.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Rad. Biol. Med.* **26**, 1231-1237
- Salah, M. B., Abdelmelek, H., Abderraba, M. (2012) Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Med. Chem.* **2**, 107-111.
- Scalbert, A., Williamson, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **22**, 2073-2085.
- Shahidi, F., Ambigaipalan P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects. *J. of Funct. Foods.* **18** , 820–897.
- Singh, N., Niyogi, R. G., Mishra, D., Sharma, M., Singh, D. (2013) Antioxidants in Oral Health and Diseases: Future Prospects. *J. Dental Med. Sci.* **10(3)**, 36-40.
- Spigno, G., Faveri, D. M. D. (2009). Microwave- assisted extraction of tea phenols, a phenomenological study. *J. Food Eng.* **93**, 210– 217.
- Vinatoru, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason. Sonochem.* **8**, 303-313.
- Vissers, M. N., Zock, P. L., Roodenburg, A. J. C., Leenen, R., Katan, M. B. (2002) Olive oil phenols are absorbed in humans. *J. Nutr.* **132**, 409–417.
- Wang, L., Weller, L.C. (2006) Recent advances in extraction of nutraceutical from plants. *Trends Food Sci. Tech.* **17**, 300-312
- Xu, B.J., Chang, S. K. (2007) A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J. Food Sci.* **72**, 159-166.
- Yaseen Khan, M. D., Panchal, S., Vyas, N., Butani, A., Vimal, K. (2007) *Olea europaea*: A phyto- pharmacological review. *Phcog Rev.* **1(1)**, 114- 118.
- Yoon, J. H., Baek, S. J. (2005) Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med. J.* **46**, 585-596.